Regulation der Pyruvatdehydrogenase-Synthese in Escherichia coli

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Jürgen Dietrich

aus Erfurt/Thüringen

1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547611_0041

Regulation der Pyruvatdehydrogenase-Synthese in Escherichia coli

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Jürgen Dietrich

aus Erfurt/Thüringen

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 10. 7. 1969

Dekan: Professor Dr. A. Seilacher
1. Berichterstatter: Professor Dr. U. Henning
2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Seyffert

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

Meinen Eltern

Herrn Prof. Dr. U. Henning danke ich für die vielseitige Unterstützung und großzügige Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit. Herrn O. Vogel danke ich herzlich für die Überlassung gereinigter PDH-Fraktionen. Den Herren Dr. V. Braun, Dr. K. Rehn und Dr. U. Schwarz möchte ich für wertvolle Diskussionen und Ratschläge zur Ausführung von Experimenten danken. Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern des Institutes meinen Dank für ihre Hilfsbereitschaft aussprechen. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Max-Planck-Gesellschaft danke ich für die Gewährung von Stipendien.

Gliederung und Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Methodischer Teil	3
1. Bakterien und genetische Methoden	3
2. Medien	7
3. Aufschlußverfahren für Bakterien	7
4. Ermittlung von Zellzahl, Verhältnis des Naßzellgewichtes zur Zellzahl und des Proteingehaltes in Rohextrakten zur Zellzahl	8
5. Enzym-Teste	9
6. Manometrische Messungen	12
7. Immunologische Methoden	13
8. Dialyse und Säulen-Chromatographie auf Sephadex G200	13
9. Gleichgewichtsdialysen	14
10. Säulen-Chromatographie auf Sephadex G25 mit Ace 64-Rohextrakten	15
11. Isolierung und Messung von mit P-32 markierter Zwischenstufen der Glykolyse aus dem Wildtyp Y-Mel bei verschiedenen Wachstumsbedingungen	15
12. Biochemische Substanzen	18
13. Konzentrationsbestimmungen von α-Ketosäuren	18
Hauptteil	19
1. Pyruvatdehydrogenase-Synthese in Wildtypen und Mutanten	19
a) Spezifische Aktivitäten der PDH nach Wachstum auf Zwischenstufen und nahen Verwandten des CSC	19
b) Bestimmung der PDH-Mengen in Wildtyp-Rohextrakten mit Kaninchen-Antiseren	20
c) Ausschluß des Abbaues von PDH im Verlauf des Wachstums und nach Erreichen der stationären Phase	20

Seite

d) Versuche zur Demonstration der regulatorischen Wirkungslosigkeit von Citrat und Acetat auf die PDH-Synthese 21

e) Hinweise auf die metabolische Verwandtschaft der Effektoren für die Pyruvatdehydrogenase- und Isocitrat-Lyase-Synthese 22

2. Die induzierende Wirkung des Pyruvates und von Pyruvat-Analoga 24

a) Ausschluß des Phosphoenolpyruvates als Effektor der PDH-Synthese 24

b) Weitere Stoffwechselwege des Pyruvates 26

c) Konstruktion der Doppelmutante K-1-1/Ace 10 27

d) PDH-Synthese im Stamm K_2-lt-5c mit konstitutiver Isocitrat-Lyase-Synthese nach Wachstum auf verschiedenen C-Quellen 28

e) Induktion der E1-Synthese in der Tripel-Mutante K_2-lt-5c/Ace 10 durch Pyruvat und α-Ketobutyrat bei Wachstum auf Acetat 29

f) Induktion der E1-Synthese in der Tripel-Mutante K_2-lt-5c/Ace 10 durch Pyruvat verschiedener Herkunft in niedrigen Konzentrationen 29

g) Belanglosigkeit der Nicht-Isogenie der Stämme Ace 10 und K_2-lt-5c 30

h) Hinweise über die mögliche Ursache des langsamen Verlaufes der Induktion der E1-Synthese in der Tripel-Mutante 30

i) Induktion der E1-Synthese in der Tripel-Mutante durch Pyruvat-Analoga 31

j) Induktion der E1-Synthese in der Doppelmutante K_2-lt-5c/Ace 10 und im Stamm Ace 10 durch Pyruvat-Analoga 33

k) Versuche über die Aufnahme von Pyruvat und α-Ketooctanoat in ruhenden Zellen 34

l) Umsetzung von α-Ketosäuren mit einer angereicherten PDH 35

Seite

3. Evidenz gegen die Rolle des Pyruvates als metabolischer Vorläufer des Effektors 37
   a) Ausschluß von Hydroxyäthyl-TPP, Acetolactat und den Vorläufern der Leucin, Isoleucin und Valin-Biosynthesen als Effektoren der PDH-Synthese 37
   b) Demonstration des Gen-Dosis-Effektes für die PDH-Synthese in Abhängigkeit hoher intrazellulärer Pyruvat-Konzentrationen in merodiploiden Stämmen 38
4. Evidenz gegen eine indirekte Wirkung des Pyruvates 41
   a) Messungen einiger Phosphor-32 markierter Zwischenstufen der Glykolyse in Wildtypen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen 41
   b) PDH-Synthese in der Mutante h8 mit Temperatur-empfindlicher Fructose 1-6-diphosphat-Aldolase bei verschiedenen Temperaturen 43
5. Bindung von 1-^{14}C-Pyruvat und 2-^{14}C-Pyruvat in Rohextrakten von Wildtypen und Mutanten und an angereicherten Pyruvatdehydrogenasen 47
   a) Bindung von 2-^{14}C-Pyruvat in Ace 10-Rohextrakt, an angereicherter PDH und an rekonstituiertem Enzym-Komplex. 48

Anhang: Das Problem des Pyruvat-Oxidase-Systemes 50
   a) Hinweise über seine Funktion im Stoffwechsel 50
   b) Charakterisierung der oxidativen Decarboxylierungs-Reaktion mit α-Ketooctansäure als Substrat 51
   c) Absolute Abhängigkeit der oxidativen Decarboxylierungs-Reaktion von TPP und spezifische Stimulierung durch Laurylsulfat 52

Seite

d) Umsetzungen von α-Ketosäuren mit einer angereicherten Pyruvat-Oxidase aus der Mutante Ace 64 53

Diskussion 55

1. Eliminierung von Hydroxyäthyl-TPP als gemeinsamen Effektor der Isocitrat-Lyase und der Pyruvatdehydrogenase-Synthese 55

2. Evidenzen gegen eine Rolle von Zwischenprodukten der Glykolyse als Effektoren der PDH-Synthese 56

3. Evidenzen gegen eine gemeinsame Regulation der PDH- und α-KGDH-Synthesen in E. coli 57

4. Funktion des phosphoroklastischen Systemes und der PDH unter anaeroben Bedingungen 59

5. Bindung von C^{14}-Pyruvat an Pyruvatdehydrogenase und ihre E1-Komponente 60

6. Zur physiologischen Bedeutung von Produkt- und Substrat-Induktion 61

Zusammenfassung 63

Verzeichnis der Abkürzungen 66

Literaturverzeichnis 68

Einleitung

In Escherichia coli und in vielen anderen Organismen (1), stellt die Pyruvatdehydrogenase (PDH) das Bindeglied zwischen der Glykolyse und dem aeroben Endabbau der Glucose dar (s.Abb.1).

Bei der PDH handelt es sich um einen Multienzym-Komplex (2), der aus einer geordneten Assoziation von 3 verschiedenen Enzymen besteht und die Gesamtreaktion:

(1) $Pyruvat+NAD^{+}+CoA \longrightarrow Acetyl\text{-}CoA+CO_2+NADH+H^{+}$

katalysiert.

Der Komplex setzt sich aus etwa 12 Molekülen Decarboxylase (Enzym 1, E1; MG = $1{,}83x10^5$), einem Molekül Dihydrolipoamid-Transacetylase (Enzym 2, E2; MG = $1{,}7x10^6$) und 6 Molekülen Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (Enzym 3, E3; MG = $1{,}2x10^5$) zusammen.

Die Komponenten bewirken in der Gesamtreaktion die folgenden Teilschritte (1,3):

(2) $Pyruvat+TPP\text{-}E1 \longrightarrow Co_2+Hydroxyäthyl\text{-}TPP\text{-}E1$

(3) $Hydroxyäthyl\text{-}TPP\text{-}E1+Lipoyl\text{-}E2 \longrightarrow$ S-Acetyl-dihydrolipoyl-E2+TPP-E1

(4) S-Acetyl-dihydrolipoyl-E2+CoA $\longrightarrow$ Acetyl-CoA+Dihydro-lipoyl-E2

(5) Dihydrolipoyl-E2+FAD-E3 $\longrightarrow$ Lipoyl-E2+FAD-E3 (reduziert)

(6) FAD-E3 (reduziert) + $NAD^{+} \longrightarrow NADH+H^{+}$+FAD-E3 (oxidiert)

Unter milden Bedingungen kann der Komplex in seine drei Komponenten zerlegt werden, denen mit Hilfe von Modellreaktionen die Aktivitäten der Reaktionen (2) bis (6) zugeordnet werden konnten. In vitro assoziiert E1 nicht mit E3, aber E2 bindet E1 wie E3 und hält damit den funktionsfähigen Komplex zusammen (4).

Der Strukturgen-Komplex (Ace-Locus) für die PDH auf dem E.coli-Chromosom umfaßt die Strukturgene für die Enzyme 1 und 2 und liegt zwischen dem Leucin-Locus und dem des T_1T_5-Receptors (5). Die Lage des Strukturgens für das Enzym 3 konnte mangels Mutanten noch nicht bestimmt werden. Sehr wahrscheinlich ist es dem Strukturgen für E2 eng benachbart. Die Synthese-Richtung der Pyruvatdehydrogenase ist derjenigen für die drei Enzym-Proteine des Lactose-Operons in E. coli entgegengesetzt (6).

Oster und Hager (7) vermuteten 1964, daß die Synthese dieses Enzymes in E. coli B constitutiv sei. Henning und Mitarbeiter (5, 6) zeigten in orientierenden Versuchen, daß unterschiedliche Mengen des Enzym-Komplexes in E. coli K 12 nach Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen auftraten. Im Rahmen von Studien über den Mechanismus dieser Regulation war es erforderlich festzustellen, ob die Synthese des Komplexes eine primär induzierbare oder reprimierbare ist. Weiter war zu klären, welche Substanz den Effektor für die Induktion oder Repression darstellt. In dieser Arbeit wurde die Lösung der beiden Fragen angestrebt und erzielt; die Synthese ist induzierbar und der induzierende Effektor ist das Substrat des Enzym-Komplexes, Pyruvat.

Methodischer Teil

1. Bakterien und genetische Methoden

E. coli K 12-Stämme:

Y-Mel λ^- : Der Ausgangsstamm Y-Mel λ^+ wurde von C. Yanofsky erhalten und von λ durch Infektion mit dem Phagen $\lambda b_2 b_5$ kuriert. Der von H. Signer isolierte $\lambda b_2 b_5$ wurde von E. Kölsch zur Verfügung gestellt.

W 1485 : Prototroph wurde von H. Kneser erhalten und zur Herstellung von Lysaten des Phagen P1 kc verwendet.

HfrH R^-_{try} Trp^- Thi^- : wurde von C. Yanofsky überlassen und besitzt eine konstitutive Synthese der Tryptophansynthase. In diesem Stamm wurden die Ace^--Mutanten Ace 64 und Ace 131 isoliert (6).

Ace 10 : wurde aus dem Wildtyp Y-Mel λ^- nach Induktion durch UV-Bestrahlung als Acetatmangel-Mutante isoliert (5).

AB 287 Thi^-, His^-, Thr^-, Leu^- : wurde von A. Adelberg überlassen.

AB 287 Thi^-, His^-, Thr^-/Ace 10: wurde durch Transduktion mit dem Phagen P1 kc nach der unter "Transduktion" beschriebenen Methode erhalten. In der Transduktion diente Ace 10 als Donor für den Rezipienten AB 287 Thi^-, His^-, Thr^-, Leu^- (5). Die Transduktanten wurden auf feste Minimalmedien mit Succinat als C-Quelle ohne Leucin und unter Zusatz von Acetat ausgespatelt. Danach wurde bei 37°C inkubiert und anschließend auf Minimalmedien mit Succinat als einziger C-Quelle replikaplattiert. Von den Originalplatten wurden die Acetat-bedürftigen Einzel-Kolonien isoliert. Ihr Acetat-Bedürfnis wurde stets auf festen Minimalmedien mit Succinat als alleiniger C-Quelle geprüft.

AB 1623 Thi^-, Glu^- : wurde von H. Kornberg erhalten und besitzt keine katalytisch aktive Citrat-Synthase.

K-1 Thi$^-$, Met$^-$, Thy$^-$: wurde von H. L. Kornberg zur Verfügung gestellt.

K-1-1 Thi$^-$, Met$^-$, Thy$^-$, PPS$^-$: wurde von H. L. Kornberg erhalten. Der Stamm besitzt keine katalytisch aktive Phosphoenolpyruvat-Synthase (PPS$^-$). Er wurde aus dem Stamm K-1 Thi$^-$, Met$^-$, Thy$^-$ gewonnen (8) Selektioniert wurde für die Unfähigkeit Pyruvat, Lactat oder Alanin als C-Quellen zu verwerten.

K-1-1 Thi$^-$, Met$^-$, Thy$^-$, PPS$^-$ /Ace 10 : wurde durch Transduktion mit dem Phagen P1 kc und dem Stamm Ace 10 als Donor wie in der für die Mutante AB 287 Thi$^-$, His$^-$, Thr$^-$/Ace 10 beschriebenen Weise erhalten. Der geforderte Charakter von K-1-1, Thi$^-$, Met$^-$, Thy$^-$, PPS$^-$ /Ace 10 als Doppel-Mutante (PPS$^-$, PDH$^-$) kann nicht durch selektive Medien erkannt werden. Daher wurde eine Methode gewählt, die ihre Unfähigkeit nachweist, Pyruvat in nennenswertem Umfang zu oxidieren. Nach Wachstum des Stammes auf Glucose unter Acetat-Zusatz wurde bei einer Zellkonzentration von $1x10^9$/ml geerntet. Nach Zentrifugation und einmaligem Waschen der Zellen in 0,1 M K-Phosphatpuffer pH 7,0 wurden diese erneut zentrifugiert. Anschließend wurden sie in frischem Puffer zu einer Zellzahl von $1,5x10^{10}$/25 ml suspendiert und 2 h belüftet. Nach Zugabe (Abb. 6) von 21 µMolen Na-Pyruvat/ml wurde die Pyruvatabnahme in der Zellsuspension über mehrere h verfolgt.

K-1-1 Thi$^-$, Met$^-$, Thy$^-$, PPS$^-$ /Ace 64 : wurde durch Transduktion mit dem Phagen P1 kc und der komplett polaren Nonsense-Mutante Ace 64 als Donor wie in der beschriebenen Weise für die Mutante AB 287 Thi$^-$, His$^-$, Thr$^-$ /Ace 10 erhalten. K-1-1 Thi$^-$, Met$^-$, Thy$^-$, PPS$^-$/Ace 64 wurde auf Nichtpermissivität für verschiedene Amber-Mutanten des Phagen T4

geprüft (6) und damit mögliche genetische Suppressoren für diese Mutante ausgeschlossen. In den Rohextrakten wurden keine enzymatisch oder immunologisch nachweisbaren Komponenten der PDH gefunden.

K-1-1 Thi^-, Met^-, Thy^-, PPS^- /Ace 131: wurde in gleicher Weise wie K-1-1 Thi^-, Met^-, Thy^-, PPS^- /Ace 64 erhalten und geprüft.

K_2-lt-5c Trp^-, His^-, Arg^-, PPS^-, Icl^c : wurde von H. L. Kornberg erhalten. Der Stamm besitzt eine konstitutive Synthese der Isocitrat-Lyase (Icl^c) und eine katalytisch inaktive Phosphoenolpyruvat-Synthase (PPS^-).

K_2-lt-5c Trp^-, His^-, Arg^-, PPS^-, Icl^c /Ace 10: wurde durch Transduktion mit dem Phagen P1 kc und dem Stamm Ace 10 als Donor wie in der für die Mutante AB 287 Thi^-, His^-, Thr^- /Ace 10 beschriebenen Weise erhalten. In diesem Fall wurde von den Originalplatten mit Succinat als C-Quelle unter Zusatz von Acetat einmal auf Succinat als alleiniger C-Quelle und zum zweiten auf Pyruvat als C-Quelle unter Acetatzusatz replikaplattiert. Es wurden dann diejenigen Einzel-Kolonien auf den Originalplatten isoliert, die auf Succinat und auf Pyruvat als C-Quellen nicht wuchsen.
Die Unfähigkeit der Tripel-Mutante, Pyruvat im nennenswerten Umfang abzubauen, wurde in gleicher Weise mit Zellsuspensionen geprüft wie für die Mutante K-1-1 Thi^-, Met^-, Thy^-, PPS^- /Ace 10.

K_2-lt-5c Trp^-, His^-, Arg^-, PPS^+, Icl^c /Ace 10: wurde durch Transduktion mit dem Phagen P1 kc und dem Stamm W 1485 als Donor und der Tripel-Mutante K_2-lt-5c Trp^-, His^-, Arg^-, PPS^-, Icl^c /Ace 10 als Rezipienten erhalten. In diesem Fall wurde von den

Originalplatten mit Succinat als C-Quelle unter Zusatz von Acetat einmal auf Succinat und zum zweiten auf Pyruvat replikaplattiert. Es wurden diejenigen Einzel-Kolonien isoliert, die Succinat nicht verwerten konnten, aber auf Pyruvat unter Acetatzusatz wuchsen.

K_2-lt-5c Trp^-, His^-, Arg^-, PPS^-, Icl^c : Das Ace^--Merkmal wurde durch Transduktion mit dem Phagen P1 kc und dem Stamm Y-Mel λ^- als Donor aus der Tripel-Mutante K_2-lt-5c Trp^-, His^-, Arg^-, PPS^-, Icl^c /Ace 10 entfernt.
Die Transduktanten wurden auf Minimal-Succinat-Medium ausgespatelt. Von diesen wurde replikaplattiert auf solche, die Pyruvat als C-Quelle enthielten. Es wurden diejenigen Einzel-Kolonien isoliert, die auf Succinat aber nicht auf Pyruvat wuchsen.

Merodiploide Stämme für den Strukturgen-Komplex der PDH : Die Konstruktion dieser Stämme ist beschrieben (9).

E. coli B : wurde von C. Yanofsky überlassen.

E. coli B /Ace 10 : wurde durch Transduktion mit dem Phagen P1 kc und dem Stamm Ace 10 als Donor wie in der für die Mutante AB 287 Thi^-, His^-, Thr^- /Ace 10 beschriebenen Weise erhalten. Benutzt wurde ein Leu^--Derivat von E. coli B.

Salmonella typhimurium LT 2 : stammt von P. Hartman.

Phagen
P1 kc : wurde von C. Yanofsky erhalten.

Transduktion: die Gewinnung von P1 kc-Lysaten und Transduktionen wurden, wie von Lennox (10) beschrieben, ausgeführt.

2. Medien

Als Vollmedien wurden L-Bouillon (10) und Penassay-Broth (Difco Antibiotic Medium 3) verwendet. In allen übrigen Fällen wurde das Minimalmedium M 9 folgender Zusammensetzung gewählt. Zu 1000 ml Aqua dest. wurden 15 g Na_2HPO_4 + 12 H_2O, 3 g KH_2PO_4 und 1 g NH_4Cl zugefügt. Danach wurde der Ansatz bei 120°C 30 Minuten autoklaviert. Nach Abkühlung wurden 1 ml $MgSO_4$ (1 M), 1 ml $FeCl_3$ (10^{-3} M) und 1 ml $CaCl_2$ (10^{-1} M) zugefügt.

Sämtliche als Kohlenstoffquellen verwendete Substanzen stammten aus üblichen Bezugsquellen. Wenn nicht anders angegeben, wurden sie in den Konzentrationen eingesetzt, die in Tab. 1 für den Wildtyp Y-Mel aufgeführt sind. Bei Zusatz von Na-Acetat zu anderen Kohlenstoffquellen wurde diese Substanz in einer Konzentration von 4 mM eingesetzt. Vitaminfreie Casaminosäuren (Difco) wurden in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Die Aminosäuren L-Threonin, L-Leucin, L-Isoleucin und L-Valin wurden in einer Konzentration von 20 µg/ml, alle übrigen Aminosäuren wurden in einer Konzentration von 40 µg/ml eingesetzt. Thyminbedürftige Zellkulturen erhielten 10 µg/ml dieser Substanz.

Na-Pyruvat: Präparat I wurde von Dr. M. Graßl (Firma C. F. Böhringer, Tutzing) zur Verfügung gestellt. Präparat II ist das im Handel erhältliche Produkt der Firma C. F. Böhringer. Präparat III wurde von der Firma E. Merck, Darmstadt, bezogen.

3. Aufschlußverfahren für Bakterien

Zwei Methoden wurden verwendet, um lösliche Zellproteine zu gewinnen.

Ultraschall: Die Zellen wurden nach Zentrifugation in 0,1 M K-Phosphatpuffer pH 7,0 suspendiert und erneut bei 15 000 UpM

10 Minuten zentrifugiert. Nach der Naßzellgewichtbestimmung wurden die Zellen zu einer Konzentration von 1 g/ml 0,1 M K-Phosphatpuffer pH 7,0 gebracht. In der Regel wurde mit dem Branson Sonifier ein Endvolumen von 3 ml 5 Minuten bei $4^{o}C$ beschallt. Danach wurde 20 Minuten bei 17 000 UpM und $4^{o}C$ zentrifugiert. Der Überstand wurde als Rohextrakt für Messungen von Enzym-Aktivitäten benutzt.

Aluminiumoxyd-Aufschluß: Die mit 0,1 M K-Phosphatpuffer pH 7,0 gewaschenen Zellen wurden mit Alcoa (Aluminium Company of America) in der doppelten Menge ihres Naßzellgewichtes vermengt. In einer Kugelmühle wurde die Mischung 20 Minuten bei $4^{o}C$ zermahlen. Danach wurde das Zellhomogenat mit 0,1 M K-Phosphatpuffer pH 7,0 (0,01 M an $MgSO_4$) versetzt, der 10 µg/ml Deoxyribonuclease (500 Einheiten/mg, Mann Research Laboratories) enthielt und dessen Volumen der doppelten Menge an Naßzellgewicht entsprach. Nach 24 h bei $4^{o}C$ wurde bei 17 000 UpM ($4^{o}C$) 20 Minuten zentrifugiert. Der Rückstand wurde mit der gleichen Menge des Puffers versetzt, der für die erste Extraktion benutzt wurde. Nach erneuter Zentrifugation bei $4^{o}C$ 20 Minuten (17 000 UpM) wurde der Überstand mit dem der ersten Extraktion vereinigt und für Messungen von Enzym-Aktivitäten benutzt.

Beide Aufschluß-Verfahren lieferten gleiche PDH-Mengen in den Rohextrakten.

4. Ermittlung von Zellzahl, Verhältnis des Naßzellgewichtes zur Zellzahl und des Proteingehaltes in Rohextrakten zur Zellzahl

Zellzahlen: wurden an Hand von Trübungs-Messungen lebender Zellen bei 436 nM im Photometer Eppendorf und durch Auszählung der Zellen in einer Zählkammer bestimmt. 0,2 Extinktionseinheiten entsprechen einer Zellzahl von $6{,}7 \times 10^{8}$/ml bei Messung gegen 0,1 M K-Phosphatpuffer pH 7,0 als Blindwert.

Verhältnis Naßzellgewicht zur Zellzahl: wurde an Hand einer Eichkurve ermittelt. 1 g Naßzellgewicht entspricht einer Zellzahl von $4{,}1 \times 10^{11}$.

Verhältnis Proteingehalt im Rohextrakt zur Zellzahl: Nach Aluminiumoxyd-Aufschluß von Zellen mit 90 g Naßzellgewicht wurden 5420 mg lösliches Zellprotein extrahiert. Ein Naßzellgewicht von 90 g entspricht $3{,}7 \times 10^{13}$ Zellen. Somit liefern $6{,}85 \times 10^{9}$ Zellen 1 mg lösliches Protein.

Proteinbestimmung

Protein: wurde mit der modifizierten Buret-Methode von Beisenherz et al. (11) gemessen.

5. Enzym-Teste

Pyruvatdehydrogenase: Die Messung der Aktivität wurde wie von Reed, Leach und Koike beschrieben (12), mit dem Pyruvat-Dismutationstest von Korkes, De Campillo, Gunsalus und Ochoa (13) vorgenommen.

Die Reaktion Pyruvat + CoASH + NAD^+ ⟶ Acetyl-CoA + CO_2 + NADH + H^+ (1) wird mit den Lactatdehydrogenase (2) und Phosphotransacetylase-Reaktionen (3) gekoppelt:

Pyruvat + NADH + H^+ ⟶ Lactat + NAD^+ (2)

Acetyl-CoA + Phosphat ⟶ Acetyl-phosphat + CoA (3),

was in der Dismutationsreaktion:

2 Pyruvat + Phosphat ⟶ Acetyl-phosphat + CO_2 + Lactat

resultiert.

Acetyl-phosphat wird mit Hydroxylamin in Acethydroxamsäure übergeführt und als Fe^{3+}-Komplex bei 546 nm im Photometer Eppendorf gemessen. Die spezifische Aktivität ist definiert als µMole Acetylphosphat, gebildet von einem mg Protein in einer Stunde bei 30°C in 0,1 M K-Phosphatpuffer pH 7,0.

Die spezifische Aktivität der Komponente E1 der PDH wurde bei Anwendung dieses Testes durch Zusatz von sättigenden Mengen von Partial-Komplex E2-E3 als spezifische Aktivität des Enzym-Komplexes gemessen. In analoger Weise wurde die spezifische Aktivität des Partial-Komplexes E2-E3 durch Zusatz von sättigenden Mengen von freier Komponente E1 als spezifische Aktivität des Enzym-Komplexes gemessen. Die Messung der enzymatischen Umsetzungen von längerkettigen Analogen des Pyruvates durch eine angereicherte PDH mit einer Proteinkonzentration von 29 mg/ml und einer spezifischen Aktivität von 900 wurde nach zwei Methoden vorgenommen:

Aktivitätsmessung nach Hager (14) sowie Stumpf, Zaradnaya und Green (15): Die Reaktion: $RCOCO_2H + 2Fe(CN_6)^{-3} + H_2O \longrightarrow RCO_2H + CO_2 + 2Fe(CN_6)^{-4} + 2H^+$ wurde spektrophotometrisch gemessen. Der Test mißt nur die Aktivität der Komponente E1 der PDH. Die spezifische Aktivität ist definiert als µMole oxidierte α-Ketosäure von einem mg Protein in einer Stunde bei 30°C in 0,1 M K-Phosphatpuffer pH 6,5.

Der molare Extinktionskoeffizient des $K_3Fe(CN)_6$ bei 436 nm beträgt 7×10^2 (cm^2Mol^{-1}). Der Enzym-Test enthielt in einem Volumen von 1,91 ml: 002 ml $K_3Fe(CN)_6$ (0,1 M), 0.02 ml TPP (0,1 M), 0,02 ml Na-Pyruvat (0,5 M) oder 0,02 ml der entsprechenden α-Ketosäure (0,5 M), 0,02 ml $MgCl_2$ (0,1 M) und Rohextrakt der zu prüfenden Zellen.

Aktivitätsmessung nach Moyed und O'Kane (16): Analog der α-Ketosäure abhängigen Reduktion des $K_3Fe(CN)_6$ wurde die α-Ketosäure abhängige Reduktion des Farbstoffes 2,6-Dichlorphenolindophenol bei 578 nm im Photometer Eppendorf verfolgt.

Die spezifische Aktivität ist definiert als µMole oxidierte α-Ketosäure von einem mg Protein in einer Stunde bei 30°C in 0,1 M K-Phosphatpuffer pH 7,8. Der molare Extinktionskoeffizient des 2,6-Dichlorphenolindophenol beträgt $2,08 \times 10^4$ (cm^2Mol^{-1}).

Der Enzym-Test enthielt in einem Volumen von 3,26 ml: 2,2 ml einer Mischung von 30 ml 1 M K-Phosphatpuffer pH 7,8 und 190 ml Aqua dest., 0,2 ml α-Ketosäure (0,5 M), 0,2 ml Phenazinmetosulfat (5 mg/ml), 0.02 ml TPP (0,01 M), 0,02 ml 2,6-Dichlorphenolindophenol (0,01 M), 0,05 ml Serumalbumin (40 mg/ml), 0,04 ml $MgCl_2$ (0,1 M) und Rohextrakt der zu prüfenden Zellen.

Aktivitätsmessung der Komponente E1 der α-KGDH: wurde nach der Methode von Hager (14) sowie Stumpf, Zaradnaya und Green (15) durchgeführt, mit der die spezifischen Aktivitäten der PDH bei Umsetzung von längerkettigen α-Ketosäuren als Substrate bestimmt wurden.

Die spezifische Aktivität der Komponente E1 der α-KGDH ist definiert als µMole oxidiertes α-Ketoglutarat von einem mg Protein in einer Stunde bei 30°C in 0,1 M K-Phosphatpuffer pH 6,5. Der Enzym-Test enthielt in einem Volumen von 2,08 ml: 0,2 ml Serumalbumin (1 mg/ml), 0,02 ml TPP (0,01 M), 0,02 ml $K_3Fe(CN)_6$ und 0,02 ml α-Ketoglutarat (0,5 M).

Pyruvat-Oxidase: Die Aktivität wurde nach der beschriebenen Methode von Hager (14) sowie Stumpf, Zaradnaya und Green (15) bestimmt. Die spezifische Aktivität der Pyruvat-Oxidase ist definiert als µMole oxidiertes Pyruvat von einem mg Protein in einer Stunde bei 30°C in 0,1 M K-Phosphatpuffer pH 6,0.

Der Enzym-Test enthielt in einem Testvolumen von 1,91 ml: 0,02 ml $K_3Fe(CN)_6$ (0,1 M), 0,02 ml TPP (0,1 M), 0,02 ml Na-Pyruvat (0,5 M) oder 0,02 ml der entsprechenden α-Ketosäure (0,5 M) und 1 µMol Laurylsulfat. Die angereicherte Pyruvat-Oxidase wurde, wie von Williams und Hager (17) beschrieben, isoliert. Die nach dem Hitzeschritt angereicherte Fraktion (Protein: 19 mg/ml) wurde für die Umsetzung der längerkettigen Analogen des Pyruvates verwendet.

Isocitrat-Lyase: Die Aktivität wurde nach der Vorschrift von Kornberg (18) bestimmt. Die spezifische Aktivität ist defi-

niert als µMole Glyoxylat, gebildet von einem mg Protein in einer Stunde bei 21°C.

Die spezifischen Aktivitäten der Isocitrat-Lyase (Tab. 1) sind die von H. L. Kornberg (19) gemessenen Werte.

ß-Galactosidase: Die Aktivität wurde in einer modifizierten Form der beschriebenen Methode (20) mit ß-O-Nitrophenyl-Galactosid als Substrat bestimmt. Der Testansatz enthielt 1 ml 0,1 M K-Phosphatpuffer pH 7,0, 0,02 ml Desoxycholat (1%), 0,2 ml ß-O-Nitrophenyl-Galactosid (0,01 M) und entsprechende Mengen vorbehandelter Zellen (Aliquote der Zellkulturen wurden mit 0,02 ml Toluol versetzt und bei 30°C 5 Minuten geschüttelt). Verfolgt wurde nach Zugabe von 0,5 ml Na_2CO_3 (1 M) die Hydrolyse des Chromogens zu freiem O-Nitrophenol, welches im alkalischen Milieu eine tautomere Umlagerung erleidet und bei 436 nm spektrophotometrisch gemessen wurde. Eine Enzym-Einheit ist definiert als eine Extinktionsdifferenz von 0,010 in einer Stunde bei 30°C. Die spezifische Aktivität der ß-Galactosidase ist als Einheiten pro 10^8 Zellen definiert.

6. Manometrische Messungen

Nach Wachstum der Tripel-Mutante K_2-lt-5c /Ace 10 (PPS^-, PDH^-, Icl^c) auf Glucose unter Acetatzusatz wurden die Zellen bei einer Konzentration von 1×10^9/ml geerntet und bei 15.000 UpM 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 0,1 M K-Phosphatpuffer pH 7,0 aufgenommen, erneut zentrifugiert und anschließend in 0,1 M K-Phosphatpuffer pH 7,0 zu einer Konzentration von $2,2 \times 10^{11}$ Zellen/2,5 ml gebracht. Die Sauerstoffaufnahme bei Oxidation des K-α-Ketooctanoates durch die Zellsuspension wurde in der Warburg-Apparatur bei 37°C verfolgt. Die Reaktion wurde gestartet durch Zukippen von 9 µMolen K-α-Ketooctanoat in 0,5 ml 0,1 M K-Phosphatpuffer pH 6 zu der Zellsuspension, deren Reaktionsgefäß im Einsatz 0,1 ml 10% KOH enthielt. Die Sauerstoffaufnahme wird ausgedrückt in µMole 1/2 O_2, aufgenommen in einer Stunde von 6×10^{11} Zellen bei 37°C.

In gleicher Weise wurde die Sauerstoffaufnahme bei Oxidation des K-α-Ketooctanoates durch die Zellsuspension der Mutante AB 287 /Ace 10 verfolgt, die für den Aufnahmeversuch verwendet wurde (Abb. 12).

7. Immunologische Methoden

Zur Hemmung der PDH-Aktivität wurde in einem Volumen von 0,30 ml 0,1 M K-Phosphatpuffer pH 7,0 0,05 ml Serumalbumin (10 mg/ml, Rind), 0,03 ml gereinigtes Enzym (1:100 Verdünnung, 11 000E/ml) und steigende Mengen an Kaninchen-Antiserum (21) eingebracht und die Mischung 30 Minuten im Eisbad inkubiert. Danach wurden 1,25 ml einer Lösung zugegeben, die alle Bestandteile des Dismutationstestes enthielt. Mit dieser Mischung wurde die verbleibende Aktivität der PDH gemessen. Die Einheit des Antiserums ist als die Menge definiert, die eine Enzym-Einheit der Pyruvatdehydrogenase inaktiviert, wenn gereinigtes Enzym benutzt wird und unter Bedingungen des Enzym-Überschusses gemessen wird.

8. Dialyse und Säulen-Chromatographie auf Sephadex G200

Nach Wachstum des Stammes AB 287 (Thi^-) auf Glucose unter Zusatz von Vitamin-freien Casaminosäuren (0,3%) wurde aus den stationären Zellen ein Rohextrakt (Protein 20,3 mg/ml) gewonnen, der für die PDH eine spezifische Aktivität von 51 aufwies. Der Rohextrakt wurde 20 h gegen 200 ml 0,1 M K-Phosphatpuffer pH 7,5 (0,02 M an $MgSO_4$ und 0,09 M an 2-Mercaptoäthanol) bei 4^oC dialysiert (dreimaliger Wechsel des Puffers), um TPP zu entfernen. Anschließend wurde der Dialysierschlauch (Größe 8/100 Ft der Union Carbide Corp.,) mit dem Rohextrakt als Inhalt bei 4^oC in trockenes Sephadex G200 eingelegt, um eine Protein-Konzentrierung zu erzielen. Bei dieser Prozedur entstand kein nennenswerter Verlust der PDH-Aktivität. Der erhaltene Rohextrakt (48 mg/ml; spez. Akt. der PDH von 100) wurde für die Bindungsversuche (Tab. 16) eingesetzt, wies

jedoch noch eine zu hohe spezifische Aktivität des PDH im Enzym-Test ohne TPP auf.

Daher wurde durch Chromatographie auf Sephadex G200 versucht, eine weitgehende TPP-Freiheit des Wildtyp-Rohextraktes, des Ace 10 Rohextraktes und der angereicherten PDH zu erzielen.

Die mit G200 gepackte Säule (2 cm x 115 cm) wurde mit 0,1 M K-Phosphatpuffer pH 7,5 (0,02 M an $MgSO_4$ und 0,09 M an 2-Mercaptoäthanol) bei 4^oC äquilibriert und mit bis zu 800 mg Protein für einen Lauf beladen. Die PDH der verschiedenen Fraktionen erschien mit dem Leervolumen der Säule, die Enzym-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und auf die Abhängigkeit der PDH-Aktivität von TPP geprüft. Danach wurde das Eluat in einem Dialysierschlauch (Größe 8/100 Ft) in trockenes G200 bei 4^oC eingelegt. Durch Messungen der Protein-Konzentration in Aliquoten wurde die Protein-Konzentrierung verfolgt und bei Erreichen der angegebenen Protein-Konzentrationen für den Wildtyp-Rohextrakt (88 mg/ml, Tab. 16), PDH-Fraktion (19 mg/ml, Tab. 17) und für den Ace 10 Rohextrakt (58 mg/ml, Tab. 18) die Einengung beendet.

Für die Berechnung der PDH-Konzentration (mg/ml) in den Proben (Tab. 16, 17, 18) wurde zugrundegelegt, daß ein mg isolierten Enzyms 5 000 Einheiten im Dismutationstest besitzt.

9. Gleichgewichtsdialysen

Für sämtliche Versuche wurden Dialysierschläuche (Größe 8/100 Ft) benutzt. Die Dialysiergefäße enthielten in allen Fällen 400 ml 0,1 M K-Phosphatpuffer pH 7,5 (0,02 M an $MgSO_4$ und 0,09 M an 2-Mercaptoäthanol). Bei Dialysen mit TPP waren die Ansätze 0,002 M an diesem Cofaktor.

1-^{14}C-Pyruvat und 2-^{14}C-Pyruvat wurden mit den in (Tab. 17, 18, 19) aufgeführten Konzentrationen zugesetzt, desgleichen wurden der Wildtyp-Rohextrakt, Ace 10 Rohextrakt, gereinigte

PDH, gereinigter Partialkomplex E2-E3 und rekonstitutierter Enzym-Komplex in den PDH-Konzentrationen benutzt, die in den Tab. 16, 17 und 18 aufgeführt sind.

Die Einstellung des Diffusionsgleichgewichtes erfolgte bei 4°C nach 3 Stunden. Nach weiteren 17 Stunden wurde die Dialyse beendet. Aliquote der Dialysierflüssigkeit und der in den Dialysierschläuchen befindlichen Protein-Lösungen (Verdünnung der Lösungen wurde berücksichtigt durch Messungen der Protein-Konzentration vor und nach Dialyse) wurden in eine Scintillatorflüssigkeit (Bray's Liquid (22)) pipettiert. Die Radioaktivität wurde mit dem Packard Scintillations-spektrometer gemessen. Hohe Protein-Konzentrationen beeinflußten die Zählausbeute nicht. Bindung von 1-^{14}C-Pyruvat und 2-^{14}C-Pyruvat in den Protein-Fraktionen wurde ausgedrückt in dem Quotienten

$$\frac{\text{Impulse pro Minute/0,01 ml Protein-Lösung}}{\text{Impulse pro Minute/0,01 ml Dialysierflüssigkeit.}}$$

10. Säulen-Chromatographie auf Sephadex 625 mit Ace 64-Rohextrakten

Die Chromatographie wurde durchgeführt, um das TPP der Pyruvat-Oxidase zu entfernen (23). Die mit 0,1 M K-Phosphatpuffer pH 6,5 bei 4°C äquilibrierte Säule (3 cm x 38 cm) wurde mit maximal 300 mg Rohextrakt beladen. Die Eluate wurden auf ihre Unfähigkeit geprüft, Pyruvat und α-Ketooctanoat im Enzym-Test (s. Pyruvat-Oxidase) ohne TPP umzusetzen. Die auf die Säule aufgegebenen Enzym-Einheiten wurden ohne Verluste zurückgewonnen.

11. Isolierung und Messung von mit P-32 markierter Zwischenstufen der Glykolyse aus dem Wildtyp Y-Mel bei verschiedenen Wachstumsbedingungen

Die Experimente wurden mit einem Minimal-Medium folgender Zusammensetzung durchgeführt: 240 mM Tris, 80 mM NaCl, 20 mM

KCl, 20 mM NH_4Cl, 3 mM NA_2SO_4 x 10 H_2O, 10 mM $MgCl_2$, 0,64 mM KH_2PO_4. Nach Einstellung des pH-Wertes der Lösung auf 7,5 wurden nach deren Sterilisation (120°C, 15 Min.) 0,2 mM $CaCl_2$ und $2x10^{-3}$ mM $FeCl_3$ hinzugefügt.

Bei anaeroben Wachstumsbedingungen: diente Glucose (50 mM) als alleinige C-Quelle.

Bei aeroben Wachstumsbedingungen wurde Na-Acetat (38 mM) als alleinige C-Quelle eingesetzt.

Die spezifische Radioaktivität des Phosphor-32 betrug in allen Versuchen 121 µC/µ Mole Phosphat.

Markierung: Die Zugabe des Phosphor-32 erfolgte zu exponentiell wachsenden 50 ml Kulturen bei einer Zellzahl von $3x10^8$/ml unter aeroben und anaeroben Bedingungen. Nach Erreichen einer Zellzahl von $1,2x10^9$/ml in beiden Kulturen wurden diese sofort bei Raumtemperatur zentrifugiert und die Zellniederschläge im Eisbad dreimal mit je 4 ml 0,1 N HCl extrahiert. Vor Zugabe von 1,5 ml einer 10% wässrigen Aktiv-Kohle-Suspension (Merck) wurden zu den Salzsäure-Extrakten beider Kulturen je 0,1 µMole Phosphogluconat, Glucose 1-phosphat, Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat und Fructose-1-6-diphosphat als Träger zugefügt. Nach Filtration der Salzsäure-Extrakte und zweimaliger Extraktion der Aktiv-Kohle-Suspension mit 5 ml 0,1 N HCl wurden die Extrakte im Rotationsverdampfer bei 40°C zur Trockne gebracht. Die Rückstände wurden in 0,6 ml 0,1 N HCl aufgenommen.

Trennung der Zuckerphosphate durch zweidimensionale Papier-Chromatographie: Whatman-Papier Nr. 1 wurde zunächst einer beschriebenen Vorbehandlung unterzogen (24). Dann wurden die bei 37°C getrockneten Papierbögen (45 cm x 35 cm) einer zweidimensionalen Vor-Chromatographie unterzogen. Für Laufrichtung I wurde das Laufmittel (25) Methanol, 88% Ameisensäure und Aqua dest. = 80/15/5 (V/V) gewählt und 24 Stunden

bei Raumtemperatur absteigend chromatographiert. Das Laufmittel (26) für Laufrichtung II bestand aus 96% Äthanol und 0,1 M Ammoniumtetraborat pH 10 = 2/2 (V/V). 0,1 M Ammoniumtetraborat pH 10 wurde aus frisch angesetzter Borsäure-Lösung, die mit 25% NH_3 bis zum gewünschten pH gebracht wurde, zubereitet (27). Mit diesem Laufmittel wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur chromatographiert. Alle verwendeten Laufmittel wurden nach einmaligem Gebrauch verworfen. Nach achtstündiger Trocknung der Papierbögen nach der Vor-Chromatographie wurden 0,2 µMole der in 0,1 N HCl gelösten Zuckerphosphate als Träger aufgebracht und danach 0,03 ml des jeweiligen Salzsäure-Extraktes aufgetragen.

Das Laufmittel für die Laufrichtung I bestand aus 96% Äthanol, 88% Ameisensäure und Aqua dest. = 80/15/5 (V/V). Pro 100 ml Solvens wurden 0,05 g Dinatrium-Äthylendiamintetraacetat zugegeben. Die Laufzeit bei Raumtemperatur betrug 24 Stunden. Danach wurden die Papierbögen 8 Stunden getrocknet. Das Laufmittel für Laufrichtung II hatte die gleiche Zusammensetzung wie das für Laufrichtung II in der Vor-Chromatographie.

Die Anfärbung der Zuckerphosphate auf den Papier-Chromatogrammen wurde, wie von Benson (28) beschrieben durchgeführt.

Radioautographie der Papier-Chromatogramme: Ein Röntgenfilm Curix Rapid (40 x 40 cm x 25, Agfa-Gevaert) wurde mit einem noch nicht angefärbten Papier-Chromatogramm in eine Film-Kassette eingelegt und nach 30 Stunden entwickelt. Nach Anfärbung des Papier-Chromatogrammes wurden die Positionen der Zuckerphosphate mit ihren entsprechenden Positionen auf dem Radioautogramm verglichen.

Die Messung der Phosphor-32 Markierung in den Zuckerphosphaten wurde mit dem "Packard Radiochromatogram Scanner Modell 7200" durchgeführt.

12. Biochemische Substanzen

1-^{14}C-Pyruvat: wurde von der New England Nuclear Corporation bezogen. Das Präparat besaß eine spezifische Radioaktivität von 4,65 mC/mM.

2-^{14}C-Pyruvat: stammte aus der gleichen Bezugsquelle und besaß eine spezifische Radioaktivität von 3,68 mC/mM.

Phosphor-32 : wurde als Träger-freies Orthophosphat in verdünnter Salzsäure (pH 2-3) steril von Buchler und Co (Braunschweig) mit einer Radioaktivität von 10 mC/ml bezogen.

Isocitrat : wurde als Lacton von der California Corporation for Biochemical Research bezogen.

ß-O-Nitrophenyl-Galactosid : wurde von Sigma (Chemical Company USA) bezogen.

Dodecylsulfat-Na-Salz (Laurylsulfat): wurde von Serva (Entwicklungslabor Heidelberg) bezogen.

13. Konzentrationsbestimmungen von α-Ketosäuren

Pyruvat : wurde mit dem optischen Test mit NADH und Lactatdehydrogenase durchgeführt (29). Die Isolierung des Pyruvates als 2,4-Dinitrophenylhydrazon wurde nach Chantrenne und Lipmann vorgenommen (30).

α-Ketooctanoat : wurde nach der Methode von Friedemann und Haugen (31) durchgeführt. Der molare Extinktionskoeffizient für das Phenylhydrazon der α-Ketooctansäure beträgt $5,4 \times 10^4$ ($cm^2 Mol^{-1}$).

Hauptteil

1. Pyruvatdehydrogenase-Synthese in Wildtypen und Mutanten

a) Spezifische Aktivitäten der PDH nach Wachstum auf Zwischenstufen und nahen Verwandten des Citronensäure-Cyclus

In früheren Versuchen fand sich, daß Wildtypstämme von E. coli K 12 nach Wachstum auf Pyruvat in Minimalmedien große Mengen an Pyruvatdehydrogenase besaßen (6). Dagegen zeigten die gleichen Wildtypstämme, denen Acetat als einzige Kohlenstoffquelle angeboten wurde, eine 10 - 15fach geringere Menge an Pyruvatdehydrogenase. In der vorliegenden Arbeit wurden in weiterführenden Studien (Tab. 1) Wildtypstämmen von E. coli K 12 Kohlenstoffquellen angeboten, die Zwischenstufen des Citronensäure-Cyclus (CSC) oder ihm nahestehende Metaboliten sind (Abb. 1). Als Wachstumssubstrate kommen natürlich nur solche Substanzen in Frage, die zum Eintritt in die Zelle befähigt sind. E. coli K 12-Stämme können weder Citrat noch Glutamat als Kohlenstoffquellen verwerten.

Ein Ausweg aus dieser Schwierigkeit ergab sich in der Verwendung von Wildtypstämmen der Organismen E. coli B und Salmonella typhimurium, nahen Verwandten der K 12-Stämme. E. coli B zeigte nach Wachstum auf Glutamat als einziger Kohlenstoffquelle keine wesentlichen Unterschiede in den PDH-Mengen, verglichen mit denen, die man nach Wachstum von E. coli K 12 auf Zwischenstufen des CSC antraf. Ebenfalls lieferte Salmonella nach Wachstum auf Citrat PDH-Mengen, die E. coli K 12 auf verwertbaren CSC-Zwischenprodukten erreichte. E. coli B und Salmonella produzierten wie E. coli K 12 auf Pyruvat hohe spezifische Aktivitäten der PDH (Tab. 1).

Züchtete man den Wildtyp Y-Mel unter anaeroben Bedingungen mit Glucose als Kohlenstoffquelle, so produzierte der Stamm etwa 3fach geringere Mengen an PDH als bei aerobem Wachstum

Tabelle 1 Spezifische Aktivitäten der Pyruvatdehydrogenase (PDH), der Komponente E1 der α-Ketoglutarsäuredehydrogenase (α-KGDH) und der Isocitrat-Lyase (Icl) in Wildtypstämmen nach Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen.

Organismus	Kohlenstoffquelle	Wachstum	Generationszeit (Min)	Sp. A. PDH	Sp. A. E1 α-KGDH	Sp. A. Icl
E.coli K12, Y-Mel	Na-Acetat 38mM	aerob	180	6-10	1,80	7
	L-Prolin 25mM	"	420	10-15	1,80	4
	K-Glykolat 20mM	"	275	15	1,95	2,8
	K-Ketoglutarat 27mM	"	120	10-20	3,70	1,2
	K-Succinat 26mM	"	75	10-20	2,30	1
	Na-Fumarat 31mM	"	78	10-20		0,9
	K-D,L-Malat 48mM	"	90	10-20		0,8
	K-L-Aspartat 24mM	"	80	15		1,9
	L-Alanin 56mM	"	114	35	2,34	1
	Na-D,L-Lactat 90mM	"	84	40-50		0,5
	Na-Pyruvat 46mM	"	118	50-60	1,7	0,25
	Glucose 22mM	"	55	25-35	0,4	0,3
	Glucose 56mM	anaerob		10	0,06	
	Glycerin 26mM	aerob	120	20-25		0,3
	L-α-Glycerophosphat 20mM	"		40		

Organismus	Kohlenstoffquelle	Wachstum	Generationszeit (Min)	Sp. A. PDH	Sp. A. E1 α-KGDH	Sp. A. Icl
E. coli B	Glucose 28mM	aerob	55	47		
	Na-Pyruvat 46mM	"	72	80		
	K-L-Glutamat 11mM	"	72	25		
Salmonella typhi-murium LT 2	Glucose 22mM	"		40		
	Na-Pyruvat 46mM	"		70		
	Na-Citrat 10mM	"		24		
	Na-Succinat 26mM	"		20		
	Na-Acetat 38mM	"		18		

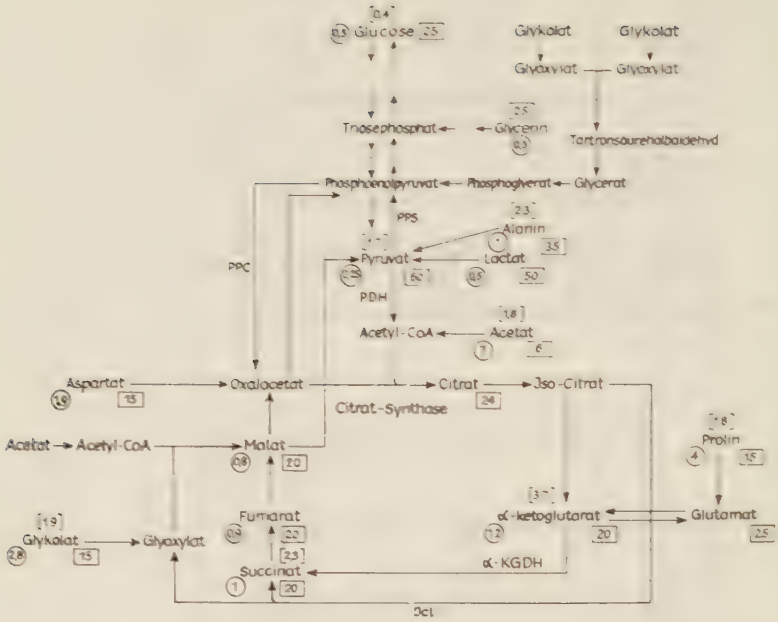


Abb. 1 Stoffwechselschema

Pyruvatdehydrogenase (PDH)

Phosphoenolpyruvat-Synthase (PPS)

Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PPC)

Isocitrat-Lyase (Icl)

α-Ketoglutarsäuredehydrogenase (α-KGDH)

▭ = Spezifische Aktivität der PDH

[ ] = Spezifische Aktivität von E1 der α-KGDH

○ = Spezifische Aktivität der Icl

auf der gleichen Kohlenstoffquelle (Tab. 1). Diese spezifischen Aktivitäten der PDH entsprachen Werten, die nach Wachstum auf Acetat unter aeroben Bedingungen angetroffen wurden.

b) Bestimmung der PDH-Mengen in Wildtyp-Rohextrakten mit Kaninchen-Antiseren

Folgender Einwand kann hinsichtlich der gemessenen spezifischen Aktivitäten der PDH auf den Kohlenstoffquellen der Tab. 1 vorgebracht werden.

Auf Glucose und den übrigen C-Quellen trifft man stets niedrigere spezifische Aktivitäten der PDH an als auf Pyruvat. Es könnte dann ein enzymatisch weniger aktives Enzym vorliegen oder - weniger wahrscheinlich - nur ein Teil des Enzymes könnte aktiv sein. Eine solche Möglichkeit erwies sich jedoch als außerordentlich unwahrscheinlich. Ein gegen gereinigte Pyruvatdehydrogenase gewonnenes Antiserum aus Kaninchen zeigte, daß die spezifische Aktivität der PDH in den Rohextrakten der Bakterien stets den berechneten Einheiten an Antiserum entsprach (Abb. 2 und 3).

c) Ausschluß des Abbaues von PDH im Verlauf des Wachstums und nach Erreichen der stationären Phase

Es mußte ebenfalls ausgeschlossen werden, daß im Verlauf des Wachstums auf einer Kohlenstoffquelle ein Abbau der synthetisierten PDH auftrat. Abb. 4 zeigt, daß frühe logarithmische Zellen des Wildtypes und Zellen in später stationärer Phase gleiche spezifische Aktivitäten des Enzymes besitzen. Wurden die späten stationären Zellen weiterhin belüftet, so traf man nach 8 Stunden die gleiche spezifische Aktivität an wie bei Beginn des Versuches.

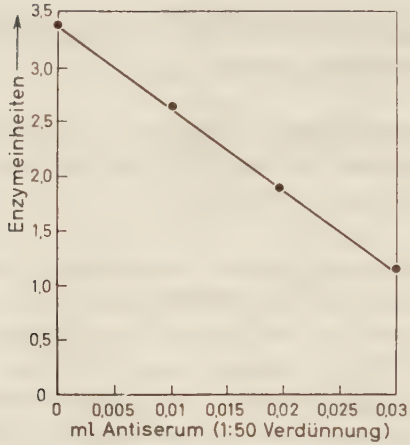


Abb. 2 Titration einer gereinigten Pyruvatdehydrogenase (11 000 Enzymeinheiten/ml) mit Kaninchen-Antiserum (s.meth.Teil).

Eingesetzt wurden je 0,03 ml gereinigtes Enzym (1:100 Verdünnung) und steigende Mengen von Antiserum einer 1:50 Verdünnung in ein Testvolumen von 1,55 ml. Die verbleibende Aktivität ist als Enzymeinheiten pro Testvolumen ausgedrückt. Der Antiserum-Titer errechnet sich danach zu 3 500 Enzymeinheiten/ml.

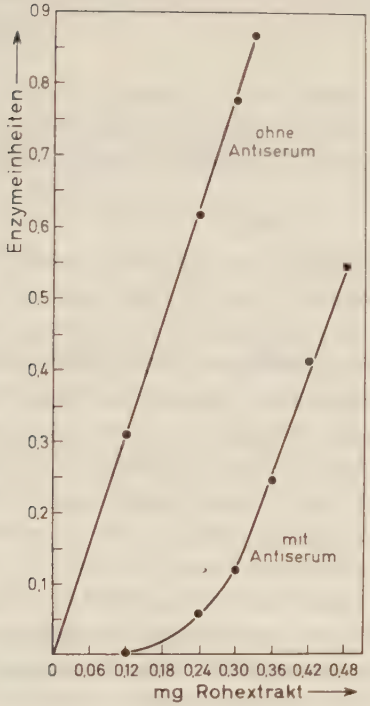


Abb. 3 Bestimmung der Pyruvatdehydrogenase-Menge mit Antiserum (3 500 E/ml) in einem Rohextrakt des Wildtypes Y-Mel nach Wachstum auf Glucose (28 M).

Eingesetzt wurden 6 Einheiten Antiserum und steigende Mengen des Rohextraktes (30 mg/ml; sp.A.d.PDH v. 26) in ein Testvolumen von 1,55 ml. Die eingesetzten Antiserum-Einheiten entsprachen den Enzymeinheiten des Rohextraktes. Die Durchführung der Messungen geschah in gleicher Weise wie für die gereinigte PDH in Abb. 2.

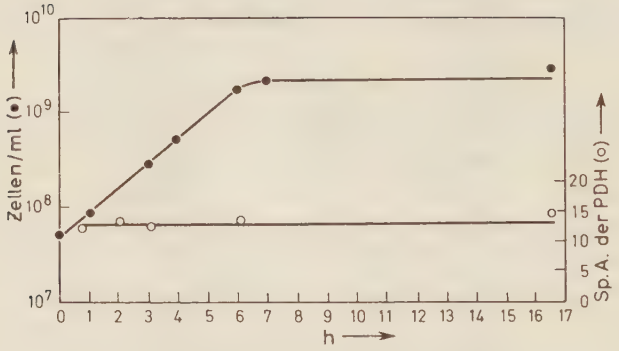


Abb. 4 Messung der spezifischen Aktivität der Pyruvatdehydrogenase im Wildtyp während der logarithmischen und stationären Wachstumsphase mit K-Succinat (26 mM) als einziger Kohlenstoffquelle.

d) Versuche zur Demonstration der regulatorischen Wirkungslosigkeit von Citrat und Acetat auf die PDH-Synthese

Die Daten der Tab. 1 erhellen die Schwierigkeiten, eine Aussage zu treffen, welcher Metabolit (Abb. 1) eine induzierende oder reprimierende Wirkung auf die Pyruvatdehydrogenase-Synthese entfaltet.

Eine physiologisch sinnvolle Regulation könnte nach den vorliegenden Resultaten (Tab. 1) auf folgende Weise geschehen. Auf Acetat als Kohlenstoffquelle wird die geringste Menge an PDH angetroffen. Ein einleuchtender Grund für diese Beobachtung könnte im Stoffwechsel des Acetates liegen (Abb. 1). Der Weg, der diesen C_2-Körper in den Stoffwechsel einschleust, führt über Acetyl-CoA. Die Pyruvatdehydrogenase liefert aus Pyruvat ebenfalls Acetyl-CoA. Die Zelle würde bei Abbau des Acetates als Kohlenstoffquelle ökonomisch handeln, wenn sie Acetyl-CoA als reprimierende Substanz auf die Enzym-Synthese der PDH einwirken ließe. Doch ebenso wie Acetyl-CoA eine reprimierende Wirkung entfalten könnte, mag auch ein Abkömmling desselben reprimierend wirken.

Experimente mit der Mutante E. coli AB 1623 (32), die keine enzymatisch aktive Citrat-Synthase produziert, machten die Vorstellung über eine reprimierende Wirkung des Acetyl-CoA oder eines Abkömmlings unwahrscheinlich. Ohne die Bildung von Citrat kann der Stamm keine Glutaminsäure synthetisieren. Wachstum auf einer Kohlenstoffquelle wie Glucose geht nur dann vonstatten, wenn sie Glutaminsäure erhält. Die spezifischen Aktivitäten der Pyruvatdehydrogenase nach Wachstum in Glucose mit Glutamat waren aber für die Mutante und den Wildtyp mit aktiver Citrat-Synthase gleich. Citrat mußte daher als reprimierende Substanz auf die Synthese der Pyruvatdehydrogenase ausscheiden. Die Rolle des Acetyl-CoA als reprimierende Substanz wurde ebenfalls zweifelhaft. Infolge des Ausfalles der Citrat-Synthase in der Mutante wird Acetyl-CoA angestaut, in

das Medium wird Acetat ausgeschieden (33). Die spezifische Aktivität der Pyruvatdehydrogenase blieb jedoch trotz vermutlich erhöhter Konzentration der mutmaßlichen reprimierenden Substanz Acetyl-CoA unverändert.

e) Hinweise auf die metabolische Verwandtschaft der Effektoren für die Pyruvatdehydrogenase- und Isocitrat-Lyase-Synthese

Ein klares Bild liefert Tab. 1 hinsichtlich der spezifischen Aktivitäten der Pyruvatdehydrogenase und Isocitrat-Lyase nach Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen. Hohe spezifische Aktivitäten der Pyruvatdehydrogenase in den Wildtypen waren immer von geringen spezifischen Aktivitäten dieses Schlüssel-Enzymes des Glyoxylsäure-Cyclus begleitet. Diese Tatsache könnte daher für eine nahe metabolische Verwandtschaft der Effektoren für die Regulation der Pyruvatdehydrogenase- und Isocitrat-Lyase-Synthese sprechen.

Weitere experimentelle Belege für einen solchen Zusammenhang lieferten Versuche mit bestimmten Mutanten. In Wildtypstämmen wurden nach Wachstum auf Succinat unter Zusatz von Acetat als Kohlenstoffquellen spezifische Aktivitäten der Isocitrat-Lyase zwischen 2 und 3 gemessen (Tab. 2). Entsprechende Werte für die Pyruvatdehydrogenase lagen zwischen 10 und 15.

In Pyruvatdehydrogenase-Mutanten fanden sich stets sehr niedrige spezifische Aktivitäten der Isocitrat-Lyase (Tab. 2). Die Acetatmangel-Mutante Ace 10 synthetisiert aufgrund einer Mutation im Strukturgen E2 die Enzym-Komponente E2 nicht mehr. Der Wildtypstamm Y-Mel, aus dem die Mutante Ace 10 selektioniert wurde, wies eine um den Faktor 20 höhere spezifische Aktivität der Isocitrat-Lyase auf als diejenige der Mutante Ace 10. Hingegen war die spezifische Aktivität

Tabelle 2 Spezifische Aktivitäten der PDH, ihrer Komponente E1 und der Isocitrat-Lyase in Wildtypen und Mutanten mit Phosphoenolpyruvat-Synthase (PPS^+) nach Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen.

Stamm	Kohlenstoffquelle	Enzymatischer Defekt	Sp.A.d.PDH	Sp.A.v.E1d.PDH	Sp.A.d.Icl	akkum. Pyruvat
Y-Mel	K-Succinat 8mM + Na-Acetat 4mM		15	-	2,3	-
HfrH	K-Succinat 8mM + Na-Acetat 4mM		11	-	3,4	-
K-1	K-Succinat 8mM + Na-Acetat 4mM		15		1,5	-
Ace 10	K-Succinat 8mM + Na-Acetat 4mM	PDH^-	-	56	0,12	+
Ace 10	Na-Acetat 38mM	PDH^-	-	7		-
Ace 64	K-Succinat 8mM + Na-Acetat 4mM	PDH^-	-	-	0,37	+
Ace 131	K-Succinat 8mM + Na-Acetat 4mM	PDH^-	-	-	0,40	+

der Komponente E1 der PDH in der Mutante um den Faktor 4 gegenüber derjenigen der PDH im Wildtyp gestiegen. Zugleich beobachtete man im Medium von Ace 10 eine Pyruvatausscheidung (Tab. 2). Prüfte man die Mutanten Ace 64 und Ace 131, die von einem HfrH-Wildtyp abgeleitet sind, so beobachtete man ebenfalls ein Absinken der spezifischen Aktivitäten ihrer Isocitrat-Lyasen gegenüber der spezifischen Aktivität der Isocitrat-Lyase im Wildtyp. Hier beträgt der Faktor etwa 10 (Tab. 2). Ace 64 und Ace 131 besitzen aufgrund einer polaren Nonsense-Mutation im E1-Gen keine enzymatisch oder immunologisch nachweisbaren Pyruvatdehydrogenase-Komponenten.

Eine weitere Evidenz für die metabolische Verwandtschaft der Effektoren für die Regulation beider Enzym-Synthesen lieferten die Mutanten K-1-1/Ace 10, K-1-1/Ace 64 und K-1-1/Ace 131. K-1-1/Ace 10 produzierte auf Vollmedium eine hohe Menge an E1 und besaß eine geringe spezifische Aktivität der Isocitrat-Lyase. Auch hier wurde eine Pyruvatanhäufung im Medium festgestellt. Die Stämme K-1-1/Ace 64 und K-1-1/Ace 131 lieferten um den Faktor 5 bis 6 geringere spezifische Aktivitäten der Isocitrat-Lyase als der Stamm K-1-1, aus dem sie abgeleitet wurden (Tab. 3). Damit ist ausgeschlossen, daß der reprimierende Effektor für die Isocitrat-Lyase-Synthese aus Pyruvat mit einer der katalytischen Aktivitäten der Pyruvatdehydrogenase gebildet wird. Ausfall der katalytischen Aktivität der Phosphoenolpyruvat-Synthase (PPS^-) im Stamm K-1-1 ist nicht Ursache der beobachteten Effekte in Tab. 3. Der Stamm K-1 mit intakter PPS besaß etwa gleiche Isocitrat-Lyase-Mengen (Tab. 2).

Nach Studien über die Regulation der Isocitrat-Lyase wird Pyruvat, Phosphoenolpyruvat oder einem ihrer nahen Abkömmlinge eine reprimierende Wirkung auf die Enzym-Synthese zugesprochen (19). Daher verstärkt sich die Vermutung, daß Pyruvat oder ein naher Verwandter induzierender Effektor der PDH-Synthese ist. Jedoch kann mit den bisher verwendeten

Tabelle 3 Spezifische Aktivitäten der PDH, ihrer Komponente E1 und der Isocitrat-Lyase in Wildtypen und Mutanten ohne Phosphoenolpyruvat-Synthase (PPS^-) nach Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen.

Stamm	Kohlenstoffquelle	Enzymatischer Defekt	Sp.A.d.PDH	Sp.A.v.E1d. PDH	Sp.A.d.Icl	akkum. Pyruvat
K-1-1	K-Succinat 8mM + Na-Acetat 4mM		14		2	-
K-1-1/Ace 10	Vollmedium	PDH^-	-	75	0,40	+
K-1-1/Ace 10	K-Succinat 8mM + Na-Acetat 4mM	PDH^-	-	50	0,20	+
K-1-1/Ace 10	Na-Acetat 38mM	PDH^-	-	9		-
K-1-1/Ace 10	Glucose 28mM + Na-Acetat 4mM	PDH^-	-	58		+
K-1-1/Ace 64	K-Succinat 8mM + Na-Acetat 4mM	PDH^-	-	-	0,31	+
K-1-1/Ace 131	K-Succinat 8mM + Na-Acetat 4mM	PDH^-	-	-	0,40	+

Stämmen die Rolle des Pyruvates als induzierender Effektor nicht sicher gestellt werden. Aufgrund der zentralen Position (Abb. 1 und 5) des Pyruvates im Stoffwechsel der Zelle wird deutlich, daß nur mit Hilfe von Mutanten mit bestimmten enzymatischen Defekten eine Umsetzung des Pyruvates verhindert werden kann. Erst dann ist ein Studium der induzierenden Aktivität des Pyruvates auf die PDH-Synthese möglich.

2. Die induzierende Wirkung des Pyruvates und von Pyruvat-Analoga

Zwei Möglichkeiten illustrieren die Notwendigkeit solcher Mutanten.

1. Pyruvat wird zu Phosphoenolpyruvat umgewandelt. Dieser Metabolit entfaltet erst die induzierende Aktivität auf die Enzym-Synthese.

2. Pyruvat als Substrat der Pyruvatdehydrogenase muß erst durch diese zu einem Reaktionsprodukt umgewandelt werden. Dieses Produkt stellt den eigentlichen induzierenden Effektor auf die Synthese der PDH dar. Eine Zwischenstufe wie das Hydroxyäthyl-TPP könnte als induzierender Effektor wirken. Ein anderes mögliches Reaktionsprodukt (Acetolactat) könnte ebenfalls die Rolle des induzierenden Effektors übernehmen.

a) Ausschluß des Phosphoenolpyruvates als Effektor der PDH-Synthese

Aus Abb. 5 ersieht man, daß die Biosynthese des Phosphoenolpyruvates aus Pyruvat in E. coli ausschließlich durch die Phosphoenolpyruvat-Synthase (PPS) geschieht. Die Pyruvat-Kinase kann in vivo die Bildung von Phosphoenolpyruvat nicht durchführen.

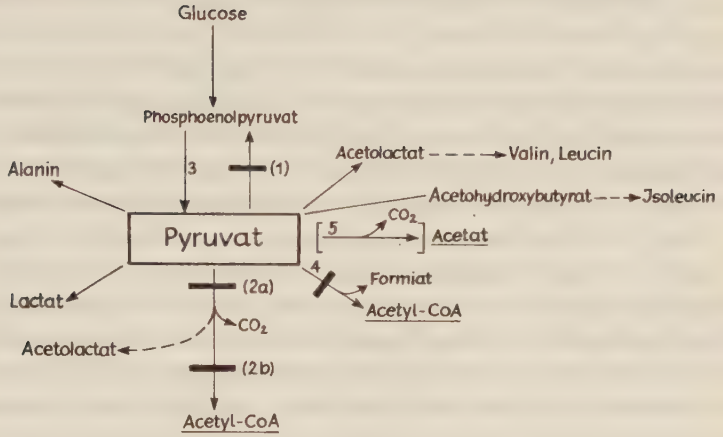


Abb. 5 Enzymatische Blocks der benutzten Mutanten und deren Relevanz zur Stellung des Pyruvates im Stoffwechsel von E. coli.

(1) : Ausfall der katalytischen Aktivität der Phosphoenol-pyruvat-Synthase.

(2a): Ausfall der katalytischen Aktivität von E1 der Pyruvat-dehydrogenase.

(2b): Ausfall der katalytischen Aktivität von E2 der Pyruvat-dehydrogenase.

(3) : Pyruvat-Kinase.

(4) : Keine katalytische Aktivität des phosphoroklastischen Systemes unter den verwendeten Versuchsbedingungen.

[5] : Pyruvat-Oxidase; zu vernachlässigende katalytische Aktivität unter den verwendeten Versuchsbedingungen.

Mutanten von E. coli ohne Synthase-Aktivität lassen sich an ihrer Unfähigkeit erkennen, auf Kohlenstoffquellen wie Pyruvat, Lactat oder Alanin zu wachsen (8).

Messungen der spezifischen Aktivitäten der PDH in Wildtypstämmen und in aus ihnen abgeleiteten Mutanten ergaben keine Anhaltspunkte für eine regulatorische Funktion des Phosphoenolpyruvates. Der Wildtyp K-1 (Tab. 2) besitzt katalytisch aktive PPS, während der aus ihm gewonnene Stamm K-1-1 (Tab. 3) kein Phosphoenolpyruvat aus Pyruvat bilden kann. Beide Stämme besitzen jedoch gleiche Mengen PDH nach Wachstum auf Succinat unter Acetatzusatz (Tab. 2 und 3). Den entscheidenden Einwand gegen die Rolle des Phosphoenolpyruvates als Effektor der PDH-Synthese lieferten Versuche mit den Mutanten Ace 10 und K-1-1/Ace 10. Wächst Ace 10 mit katalytisch aktiver PPS auf Succinat unter Acetatzusatz, so wurde die freie Komponente E1 der PDH induziert und eine Pyruvatabgabe in das Medium festgestellt. Die E1-Synthese in der Mutante Ace 10 gehorcht der gleichen Kontrolle wie die Synthese des Enzym-Komplexes (Tab. 1). Dies wird durch die spezifische Aktivität der Komponente E1 nach Wachstum der Mutante auf Acetat belegt (Tab. 2).

Im Gegensatz zu Ace 10 besitzt der Stamm K-1-1/Ace 10 keine Phosphoenolpyruvat-Synthase-Aktivität. Trotzdem lieferte er nach Wachstum auf derselben Kohlenstoffquelle die gleiche E1-Menge und eine Pyruvatanhäufung im Medium, obwohl durch die katalytische Inaktivität der PPS nicht die gleiche intrazelluläre Konzentration des mutmaßlichen Effektors Phosphoenolpyruvat zu erwarten ist wie in Ace 10 (Tab. 3). Wachstum auf Glucose unter Acetatzusatz resultierte bei K-1-1/Ace 10 etwa in den gleichen spezifischen Aktivitäten der Komponente E1 wie auf Succinat unter Acetatzusatz, obgleich Phosphoenolpyruvat aus dem Glucoseabbau angeliefert wurde (Tab. 3).

b) Weitere Stoffwechselwege des Pyruvates

Weitere Pyruvatabkömmlinge sind die Vorläufer in der Biosynthese des Valins, Isoleucins und Leucins. Auch sie können als mögliche Induktoren in Betracht kommen (Abb. 5). Eine physiologisch sinnvolle Regulation der Pyruvatdehydrogenase durch diese Metaboliten ist schwer vorstellbar. Die im Abschnitt 3 beschriebenen Versuche schließen darüber hinaus diese Substanzen als Effektoren aus.

Die unmittelbaren Abkömmlinge Lactat und Alanin kommen ebenfalls als Induktoren nicht in Frage. Wachstum auf Lactat oder Alanin als einzigen Kohlenstoffquellen (Tab. 1) lieferte zwar hohe spezifische Aktivitäten der Pyruvatdehydrogenase. Diese waren jedoch stets niedriger als nach Wachstum auf Pyruvat.

Schließlich sind noch zwei Enzym-Systeme zu besprechen, die Pyruvat umsetzen können. Das phosphoroklastische System bildet aus Pyruvat Formiat und Acetyl-CoA nur unter strikt anaeroben Bedingungen (34). Die hier geschilderten Versuche laufen immer unter aeroben Bedingungen ab, bei denen das phosphoroklastische System vollständig gehemmt ist (Abb. 5). Das Pyruvat-Oxidase-System (Abb. 5) liefert in einer oxidativen Decarboxylierung aus Pyruvat Acetat und CO_2 (35). Seine katalytische Aktivität muß in den untersuchten Stämmen außerordentlich gering sein. Denn der Ausfall der katalytischen Aktivität der PDH führt in den betroffenen Stämmen wie Ace 10 zu einem Bedürfnis für Acetat bei Wachstum auf Glucose. Die Pyruvat-Oxidase ist in diesen Stämmen gleichermaßen nachweisbar wie in den Wildtypen mit intakter PDH. Die Pyruvat-Oxidase ist also nicht in der Lage, das angelieferte Pyruvat aus der glykolytischen Sequenz hinreichend rasch zu Acetat zu oxidieren, um somit den Ausfall der Pyruvatdehydrogenase zu kompensieren.

Jedoch würde dies keinesfalls die Möglichkeit ausschließen, daß durch die katalytische Aktivität der Pyruvat-Oxidase aus Pyruvat der eigentliche Effektor der PDH-Synthese gebildet wird. Im Abschnitt 3 wird mit einem Thiamin-auxotrophen Stamm demonstriert, daß bei Thiaminentzug die Thiaminpyrophosphat-bedürftige PDH in vivo katalytisch inaktiv ist, aber volle Induktion ihrer Synthese angetroffen wird. Aufgrund der TPP-Abhängigkeit der Pyruvat-Oxidase-Aktivität kommt also dies Enzym-System nicht als Effektor-Lieferant in Frage.

c) Konstruktion der Doppelmutante K-1-1/Ace 10 (PPS^-, PDH^-)

Eine Mutante mit katalytisch inaktiver PPS und PDH dürfte nicht mehr in der Lage sein, Pyruvat in nennenswertem Umfang umzusetzen. Zwei Arten von Mutationen in dem Pyruvatdehydrogenase-Komplex ziehen den Verlust der enzymatischen Aktivität in der Gesamtreaktion nach sich. Der Block (2a) in Abb. 5 symbolisiert den Ausfall der Enzym-Komponente E1. Ausfall der Enzym-Komponente E2 resultiert in Block (2b) (Abb. 5). Die Mutante Ace 10 mit Block in (2b) synthetisiert die enzymatisch aktive Komponente E1 (Tab. 2). Es wurde daher die Doppelmutante K-1-1/Ace 10 (PPS^-, PDH^-) konstruiert (s. meth. Teil). Erwartungsgemäß erwies sie sich als unfähig, Pyruvat zu verbrauchen (Abb. 6). Aus Tab. 3 wird ersichtlich, daß das angestaute Pyruvat aus dem Abbau der beiden Kohlenstoffquellen Succinat und Acetat durch die Doppelmutante zur Induktion der Enzym-Komponente E1 führte. Kohlenstoffquellen wie Succinat sind aber natürlich zum Nachweis der induzierenden Wirkung des Pyruvates unbrauchbar, da die E1-Synthese in der Doppelmutante bei Wachstum auf Succinat schon induziert ist.

Ausweichen auf Na-Acetat als einzige Kohlenstoffquelle beseitigt diese Schwierigkeiten, wie Tab. 3 zeigt. Jedoch stellt sich ein zweites Problem ein. Zugabe von Pyruvat zu Acetat abbauenden Zellen der Doppelmutante K-1-1/Ace 10 oder zu Zellen der Mutante K-1-1 (Abb. 7) führte zu einer voll-

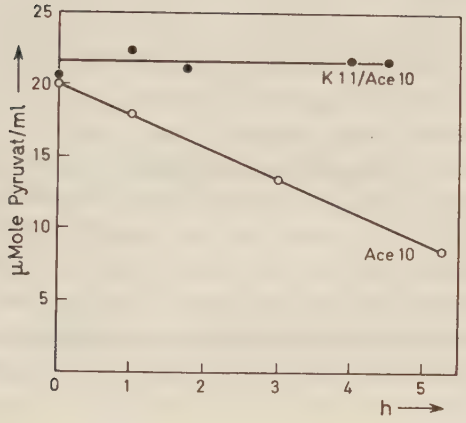


Abb. 6 Pyruvatabnahme in der Zellsuspension (●) der Mutante K-1-1/Ace 10 (PPS^-, PDH^-) und in der Zellsuspension (○) des Stammes Ace 10 (PPS^+, PDH^-).

Die Zellsuspension von Ace 10 wurde in gleicher Weise gewonnen wie die der Mutante K-1-1/Ace 10 und mit der beschriebenen Methode für diese die Messungen durchgeführt (s.meth.Teil).

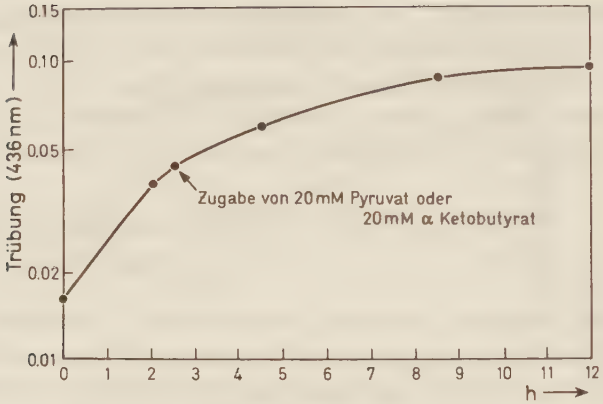


Abb. 7 Effekt von Pyruvat und α-Ketobutyrat auf das Wachstum der Mutante K-1-1 (PPS^-, Icl^+) mit Na-Acetat (35 mM) als einziger Kohlenstoffquelle.

Die Mutante hat keine Phosphoenolpyruvat-Synthase-Aktivität (PPS^-) und besitzt normale Mengen an Icl. Durch Zugabe von Pyruvat oder α-Ketobutyrat wird die Aktivität der Icl gehemmt, woraus die Hemmung des Wachstums der Zellen auf Acetat resultiert.

ständigen Wachstumshemmung der Kulturen. Die Ursache des Wachstumsstillstandes der Zellen lag in der Hemmung der Isocitrat-Lyase durch das zugefügte Pyruvat. Denn die Isocitrat-Lyase fungiert als Schlüsselenzym im Acetatabbau von E. coli und katalysiert die Spaltung des Isocitrats in Succinat und Glyoxylat (36). Die nachgeschaltete Malat-Synthase kondensiert das angelieferte Glyoxylat mit Acetyl-CoA zur benötigten Zwischenstufe Malat (Abb. 1). Bei Hemmung der katalytischen Aktivität der Isocitrat-Lyase sind daher Acetat-abbauende Zellen nicht mehr in der Lage, für die Aufrechterhaltung der notwendigen Konzentrationen von C_4-Körpern zu sorgen. Diese werden nicht nur für den energieliefernden CSC benötigt, sondern auch für Biosynthesen (z.B. Aspartat und die daraus gebildeten Aminosäuren). Somit ist eine Abnahme der Proteinsynthese zu erwarten. Folglich kann auch keine Induktion der Pyruvatdehydrogenase-Synthese erwartet werden.

d) PDH-Synthese im Stamm K_2-lt-5c mit konstitutiver Isocitrat-Lyase-Synthese nach Wachstum auf verschiedenen C-Quellen

Einen Ausweg aus diesem Dilemma boten Mutanten mit defekter Regulation der Isocitrat-Lyase (37). Diese produzieren das Enzym konstitutiv. Daher werden unter allen Wachstumsbedingungen hohe Mengen an Isocitrat-Lyase angetroffen. Eine solche Mutante ist der Stamm K_2-lt-5c (PPS^-, Icl^c). Aus Tab. 4 ersieht man, daß das Verhalten seiner Pyruvatdehydrogenase nicht von dem Defekt in der Regulation der Isocitrat-Lyase beeinflußt wird. Aufgrund der hohen spezifischen Aktivitäten der Icl in diesem Stamm erreichte die Hemmung ihrer katalytischen Aktivität durch Pyruvat nicht das Ausmaß, um Wachstum auf Acetat zu behindern. Die Mutante zeigte (Abb. 8) eine unveränderte Generationszeit nach Zugabe von Pyruvat oder α-Ketobutyrat.

Tabelle 4 Spezifische Aktivitäten der PDH und Icl in der Mutante K_2-lt-5c (PPS^-, Icl^c) ohne Phosphoenolpyruvat-Synthase und mit konstitutiver Synthese der Isocitrat-Lyase nach Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen.

Stamm	Kohlenstoffquelle	PPS	Sp.A.d.PDH	Sp.A.d.Icl	akkum. Pyruvat
K_2-lt-5c	K-Succinat 8mM + Na-Acetat 4mM	-	13	24	-
K_2-lt-5c	Na-Acetat 38mM	-	4	31	-

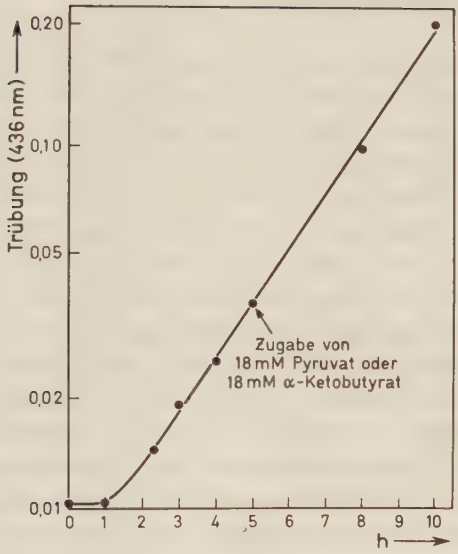


Abb. 8 Effekt von Pyruvat und α-Ketobutyrat auf das Wachstum der Doppelmutante K_2-lt-5c (PPS^-, Icl^c) mit Na-Acetat (35 mM) als einziger Kohlenstoffquelle.

Die Mutante hat keine Phosphoenolpyruvat-Synthase-Aktivität (PPS^-) und besitzt eine konstitutive Synthese der Isocitrat-Lyase (Icl^c). Die Hemmung der katalytischen Aktivität der Icl durch das zugefügte Pyruvat oder α-Ketobutyrat erreicht nicht das Ausmaß, um das Wachstum der Zellen auf Acetat zu behindern.

e) Induktion der E1-Synthese in der Tripel-Mutante K_2-1t-5c/Ace 10 durch Pyruvat und α-Ketobutyrat bei Wachstum auf Acetat

Durch die Konstruktion der Tripel-Mutante K_2-1t-5c/Ace 10 (PPS^-, PDH^-, Icl^c) war es jetzt möglich, die induzierende Aktivität von Pyruvat und Pyruvat-Analoga auf die E1-Synthese während des Wachstums auf Acetat zu studieren. Die Tripel-Mutante lieferte, wie Tab. 5 zeigt, nach Erreichen der stationären Phase auf Acetat eine spezifische Aktivität der Komponente E1 der PDH von 16. Wachstum auf der gleichen Kohlenstoffquelle in Gegenwart von Pyruvat führte stets zur Induktion der E1-Synthese. Wachstum auf den Zwischenstufen des CSC (z.B. Succinat, Tab. 5) resultierte wie im Fall der Doppelmutante K-1-1/Ace 10 (PPS^-, PDH^-) in einer Pyruvatabgabe in das Medium, verbunden mit einer hohen E1-Synthese. Die Komponente E1 der α-Ketoglutarsäuredehydrogenase (α-KGDH) ist nicht Ziel der induzierenden Aktivität des Pyruvates. Ihre spezifische Aktivität zeigte keine Änderung, wenn Induktion der E1-Synthese der PDH erfolgte (Tab. 5).

Nach Zugabe von Pyruvat (17,5 mM) zu logarithmisch wachsenden Zellen der Tripel-Mutante, die Acetat als einzige C-Quelle und Energiequelle verwertete, stieg sofort die differentielle Geschwindigkeit der Enzym-Synthese an (Abb. 9). Für etwa zwei Generationen wurde keine Pyruvatabnahme im Medium festgestellt. Danach wurde eine geringe Abnahme der Konzentration des Pyruvates bis zur Beendigung des Induktionsvorganges gemessen. α-Ketobutyrat zeigte gleiche induzierende Aktivität. Doch blieb die Konzentration des Pyruvat-Analogen während der Versuchsdauer konstant.

f) Induktion der E1-Synthese in der Tripel-Mutante K_2-1t-5c/Ace 10 durch Pyruvat verschiedener Herkunft in niedrigen Konzentrationen

Gleiche induzierende Aktivität auf die Enzym-Synthese der

Tabelle 5 Einfluß der Kohlenstoffquellen auf die Synthese der Komponente E1 der PDH und auf die der Komponente E1 der α-KGDH in der Tripel-Mutante K_2-lt-5c/Ace 10 (PPS^-, PDH^-, Icl^c).

Stamm	Kohlenstoffquelle	Sp.A.v.E1d.PDH	Sp.A.v.E1d.α-KGDH
K_2-lt-5c/ace 10 ($TPPS^-$,PDH^-,Icl^c)	Na-Acetat 38mM	16	1,2
K_2-Lt-5c/Ace 10 (PPS^-,PDH^-,Icl^c)	Na-Acetat 38mM + Na-Pyruvat 24mM	48	1,2
K_2-lt-5c/Ace 10 (PPS^-,PDH^-,Icl^c)	K-Succinat 8mM + Na-Acetat 4mM	55	1,4

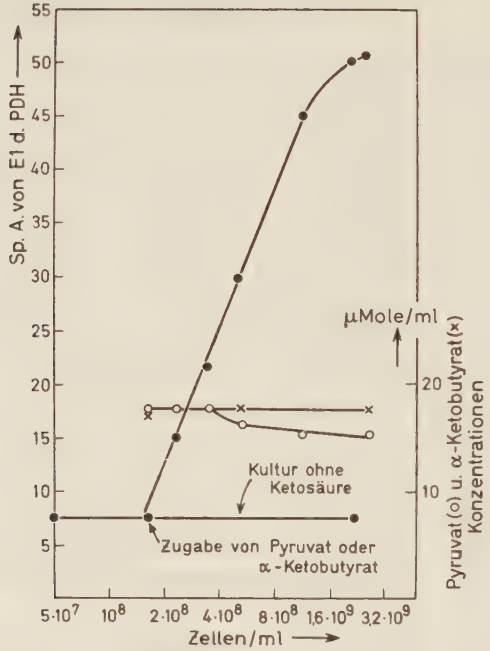


Abb. 9 Effekt von Pyruvat und α-Ketobutyrat auf die differentielle Synthese-Geschwindigkeit der Komponente E1 der PDH in der Tripel-Mutante K_2-lt-5c/Ace 10 (PPS^-, PDH^-, Icl^c) bei Wachstum auf Na-Acetat (35 mM) als einziger Kohlenstoffquelle.

Komponente E1 der PDH entfaltete Pyruvat auch in niedrigeren Konzentrationen als 17,5 mM. In Tab. 6 sind die spezifischen Aktivitäten der Komponente E1 aufgeführt, deren Induktion mit Na-Pyruvat verschiedener Herkunft (s. meth. Teil) in einer Konzentration von 5 mM gelang. Das Präparat I enthielt ausschließlich durch Lactatdehydrogenase umsetzbares Na-Pyruvat. Die Präparate II und III, im Handel erhältliche Substanzen, besaßen neben enzymatisch umsetzbarem Na-Pyruvat Verunreinigungen in einer Konzentration von 21%.

Tab. 6 zeigt, daß die Präparattypen (I, II, III) keine unterschiedlichen induzierenden Aktivitäten entfalteten. Die spezifischen Aktivitäten der Komponente E1 der PDH unterschieden sich nicht wesentlich. Ein möglicher Einwand über eine induzierende Aktivität einer unbekannten Substanz in den handelsüblichen Präparaten ist somit widerlegt.

g) Belanglosigkeit der Nicht-Isogenie der Stämme Ace 10 und K_2-lt-5c

Ein zweiter Einwand betraf die genetische Herkunft der Tripel-Mutante, die aus zwei nicht-isogenen Stämmen Ace 10 (PDH^-) und K_2-lt-5c (PPS^-, PDH^+, Icl^c) konstruiert wurde. Die genetische Konstitution des Stammes Ace 10 könnte allein verantwortlich sein für die Induzierbarkeit der Enzym-Synthese der unversehrten Komponente E1 in der Tripel-Mutante. Daher wurde durch Transduktion aus der Tripel-Mutante der Ausgangsstamm K_2-lt-5c (PPS^-, PDH^+, Icl^c) zurückgewonnen. Tab. 7 zeigt, daß die Synthese der PDH in diesem Stamm durch Pyruvat induzierbar ist. Folglich ist die unterschiedliche genetische Abkunft der Stämme, die für die Konstruktion der Tripel-Mutante verwendet wurden, ohne Belang.

h) Hinweise über die mögliche Ursache des langsamen Verlaufes der Induktion der E1-Synthese in der Tripel-Mutante

Die Kinetik der Induktion der Komponente E1 in der Tripel-

Tabelle 6 Effekt von Pyruvat verschiedener Herkunft (s. meth. Teil) auf die Synthese der Komponente E1 der PDH in der Tripel-Mutante K_2-lt-5c/Ace 10 (PPS^-, PDH^-, Icl^c).

Stamm	Kohlenstoffquelle	Pyruvatzugabe	Präparat-Typ	Sp.A.v.E1d.PDH
K_2-lt-5c/Ace 10 (PPS^-,PDH^-,Icl^c)	Na-Acetat 38mM	-	-	15
	"	5mM	I	62
	"	5mM	II	65
	"	5mM	III	78

Tabelle 7 Effekt von Pyruvat auf die Synthese der Pyruvatdehydrogenase in dem Stamm K_2-lt-5c (PPS^-, PDH^+, Icl^c), welcher aus der Tripel-Mutante K_2-lt-5c/Ace 10 (PPS^-, PDH^-, Icl^c) zurückgewonnen wurde (s. meth. Teil).

Stamm	Kohlenstoffquelle	Zugabe von Pyruvat	Sp. A. d. PDH
K_2-lt-5c (PPS^-,PDH^+,Icl^c)	Na-Acetat 38mM	-	12
	Na-Acetat 38mM	18mM	52

Mutante zeigt, daß erst nach 5-6 Stunden die maximale spezifische Aktivität erreicht ist. Der mögliche Einfluß des Acetates als Kohlenstoffquelle auf den zeitlichen Verlauf der Induktion der E1-Synthese in der Tripel-Mutante kann allerdings nur indirekt bestätigt werden, denn außer Acetat führt Wachstum der Tripel-Mutante auf allen übrigen Kohlenstoffquellen zur Induktion der E1-Synthese (Tab. 5). Aus diesem Grunde wurde ein anderes leicht meßbares Enzym, die ß-Galactosidase in der Tripel-Mutante untersucht. Die Induktion ihrer Synthese gelingt mit Isopropylthiogalactosid (IPTG). Diese Substanz wird in der Zelle nicht abgebaut. Zwei Experimente zeigten den Einfluß der Kohlenstoffquelle auf den zeitlichen Verlauf der Enzym-Induktion (Abb. 10).

Bei Wachstum der Tripel-Mutante in Na-Acetat wurde erst 150 Minuten nach Zugabe des Induktors zu exponentiellen Zellen die maximale spezifische Aktivität gemessen. Dieser "Acetat-Effekt" auf den Zeitverlauf der Induktion der ß-Galactosidase könnte auch auf den Induktionsverlauf der Komponente E1 einwirken. Wendet man den Faktor auf die Komponente E1 an, so würde die Tripel-Mutante z.B. auf Glycerin nur 60 Minuten nach Zugabe des Pyruvates benötigen, um die maximale Menge der Komponente E1 zu synthetisieren.

i) Induktion der E1-Synthese in der Tripel-Mutante durch Pyruvat-Analoga

Kulturen der Tripel-Mutante, die auf Acetat wachsen, wurden verschiedene α-Ketosäuren zugefügt (Tab. 8). Die gemessenen spezifischen Aktivitäten der Komponente E1 zeigen eine erfolgreiche Induktion an. Mit steigender Kettenlänge nahm die induzierende Aktivität der α-Ketosäuren ab. Hier tauchte jedoch folgende Schwierigkeit auf. Um den Vergleich der induzierenden Aktivitäten untereinander durchzuführen, dürften die spezifischen Aktivitäten der Komponente E1 vor Zugabe des jeweiligen Induktors nur geringe Abweichungen

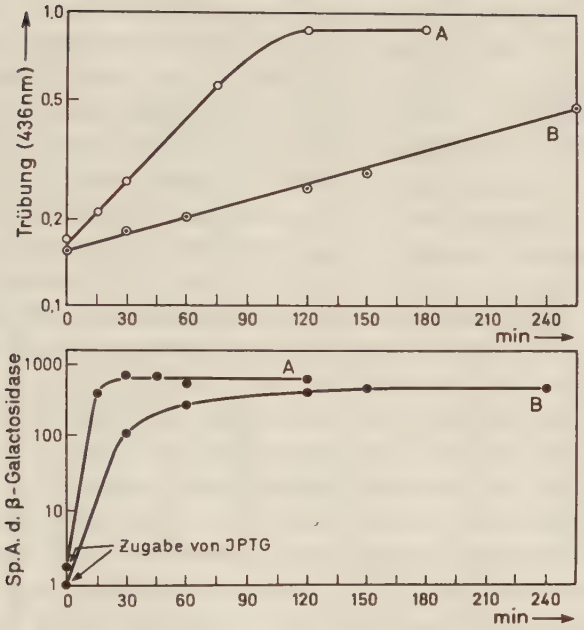


Abb. 10 Kinetik der ß-Galactosidase-Induktion durch IPTG ($5x10^{-4}$ M) in der Tripel-Mutante K_2-lt-5c/Ace 10 (PPS^-, PDH^-, Icl^c).

(A) bei Wachstum auf Glycerin (44 mM) unter Acetatzusatz (4 mM). (B) bei Wachstum auf Na-Acetat (35 mM).

Tabelle 8 Messung der spezifischen Aktivitäten der Komponente E1 der PDH in logarithmischen und stationären Zellen der Tripel-Mutante K_2-lt-5c/Ace 10 (PPS^-, PDH^-, Icl^c). Effekt von α-Ketosäuren auf die Enzym-Synthese.

Stamm	Kohlenstoff-quelle	Zugabe von α-Keto-säuren	Sp.A.v.E1d.PDH	Wachstumsphase bei Zellernte
K_2-lt-5c/Ace 10 (PPS^-,PDH^-,Icl^c)	Na-Acetat 38mM	-	8	logarithmisch
		Na-Pyruvat 15mM	50	stationär
K_2-lt-5c/Ace 10 (PPS^-, PDH^-,Icl^c)	Na-Acetat 38mM	-	14	logarithmisch
		K-α-Ketobutyrat 16mM	53	stationär
K_2-lt-5c/Ace 10 (PPS^-,PDH^-,Icl^c)	Na-Acetat 38mM	-	7	logarithmisch
		K-α-Ketovaleriat 16mM	27	stationär
K_2-lt-5c/Ace 10 (PPS^-,PDH^-,Icl^c)	Na-Acetat 38mM	-	8	logarithmisch
		K-α-Ketocaproat 12mM	18	stationär

zeigen. In den logarithmischen Stadien vor Induktion der Komponente E1 wurden jedoch in der Tripel-Mutante um den Faktor 2 schwankende spezifische Aktivitäten angetroffen (Tab. 8). Diese Schwankungen der basalen spezifischen Aktivitäten während des Wachstumsverlaufes der Tripel-Mutante auf Acetat können auch ausbleiben. Abb. 9 zeigt, daß von der logarithmischen bis zur frühen stationären Phase die spezifische Aktivität der Komponente E1 keine Anderung erleidet. Eine vollständige experimentelle Klärung für dieses Verhalten der schwierig zu handhabenden Tripel-Mutante konnte nicht erbracht werden. Jedoch lieferten einige Versuche mit dieser Mutante Hinweise über die mögliche Ursache unterschiedlicher spezifischer Aktivitäten in den Wachstumsphasen auf Acetat. Aus Tabelle 9 wird ersichtlich, daß die Synthese der Komponente E1 in späten stationären Zellen der Tripel-Mutante eine teilweise Induktion erleidet. Der Verdacht bestätigte sich, daß in den späten Stadien des Wachstums eine Pyruvatanstauung in der Zelle stattfindet, verbunden mit der Induktion der E1-Synthese. Tab. 9 zeigt, daß die hohen spezifischen Aktivitäten der Komponente E1 stationärer Zellen mit einer Pyruvatabgabe in das Medium verknüpft waren. Diese Tatsache könnte folgende Vermutung stützen. In den logarithmischen und frühen stationären Phasen besteht ein Bedarf an den Vorläufern für die Zellwand-Biosynthese. Diese sind neben anderen Substanzen vor allem Zucker, die aus Pyruvat gebildet werden. Tritt die Tripel-Mutante in die stationäre Phase ein, benötigt sie wahrscheinlich weniger Glucose für die Bildung der Zellwandbestandteile. Die Oxidation des Acetates als Kohlenstoffquelle läuft dagegen unvermindert weiter. Die Menge des angelieferten Pyruvates mag jetzt den Bedarf der Zellen an dieser Substanz für die Gluconeogenese übersteigen. Die spezifischen Aktivitäten der Komponente E1 reflektieren offenbar die unterschiedlichen intrazellulären Pyruvat-Konzentrationen in den logarithmischen und stationären Phasen des Wachstums auf Acetat ohne Zusatz von Induktoren.

Tabelle 9 Spezifische Aktivitäten der Komponente E1 der PDH in stationären Zellen der Tripel-Mutante K_2-lt-5c/Ace 10 (PPS^-, PDH^-, Icl^c). Effekt von α-Ketosäuren auf die Enzym-Synthese.

Stamm	Kohlenstoff-quelle	Zugabe von α-Keto-säuren	Sp.A.v.E1 d.PDH	Wachstumsphase bei Zellernte	akkum. Pyruvat µMole/ml
K_2-lt-5c/Ace 10 (PPS^-,PDH^-,Icl^c)	Na-Acetat 38mM	-	23	stationär	
		Na-Pyruvat 12mM	67	"	
		K-α-Ketocaproat 12mM	42	"	
		K-α-Ketooctanoat 6mM	50	"	
K_2-lt-5c/Ace 10 (PPS^-,PDH^-,Icl^c)	Na-Acetat 38mM	-	32	"	0,04
		K-α-Ketononanoat 6mM	52	"	
		K-α-Ketodecanoat 6mM	35	"	
		K-Decanoat 6mM	33	"	

Tab. 9 liefert trotz erhöhter spezifischer Aktivitäten von E1 in stationären Zellen ohne Zusatz einer α-Ketosäure ein einheitliches Bild. Die längerkettigen Analoga des Pyruvates besitzen bis zur α-Ketononansäure induzierende Aktivität. Die α-Ketodecansäure besitzt keine meßbare induzierende Aktivität mehr (Tab. 9 und 10).

Die Decansäure mit gleicher Kohlenstoffzahl liefert dieselbe spezifische Aktivität (Tab. 9).

j) Induktion der E1-Synthese in der Doppelmutante K_2-1t-5c/Ace 10 (PPS^+, PDH^-, Icl^c) und im Stamm Ace 10 durch Pyruvat-Analoga

Zur sicheren Eingruppierung der einzelnen α-Ketosäuren hinsichtlich des Ausmaßes ihrer induzierenden Aktivitäten kann die Tripel-Mutante nicht dienen. Verwendete man die Doppelmutante K_2-1t-5c/Ace 10 (PPS^+, PDH^-, Icl^c) und die Mutante Ace 10 für die Induktionsversuche (Tab. 10), so beobachtete man nur geringe Schwankungen der spezifischen Aktivitäten der Komponente E1 in den Wachstumsphasen auf Acetat ohne Zusatz von Induktoren. Dies ist zu erwarten. Die Doppelmutante, mittels Transduktion aus der Tripel-Mutante erhalten (s. meth. Teil), besitzt wieder katalytisch aktive Phosphoenolpyruvat-Synthase. Angeliefertes Pyruvat, für welches in den stationären Phasen ein verminderter Bedarf besteht, wird also nicht angehäuft werden. Die Doppelmutante wie auch der Stamm Ace 10 mit katalytisch aktiven Enzymen zeigten keine Pyruvatabgabe in das Medium in den stationären Phasen. Sie besaßen in allen Wachstumsphasen auf Acetat basale spezifische Aktivitäten der Komponente E1.

Daher konnte mit den verwendeten Stämmen (Tab. 10) sicher gezeigt werden, daß den unverzweigten α-Ketosäuren mit steigender Kettenlänge abnehmende induzierende Aktivitäten zukommen. Zweifelsfrei besitzt die α-Ketodecansäure keine induzierende Aktivität auf die E1-Synthese der PDH. Für die

Tabelle 10 Messung der spezifischen Aktivitäten der Komponente E1 der PDH in logarithmischen und stationären Zellen der Doppelmutante K_2-lt-5c/Ace 10 (PPS^+, PDH^-, Icl^c) und der Mutante Ace 10 (PPS^+, PDH^-). Effekt von α-Ketosäuren auf die Enzym-Synthese.

Stamm	Kohlenstoffquelle	Zugabe von α-Ketosäuren	Spez.A.v.E1d.PDH	Wachstumsphase bei Zellernte
K_2-lt-5c/Ace 10 (PPS^+,PDH^-,Icl^c)	Na-Acetat 38mM	-	9	logarithmisch
		-	13	stationär
		K-α-Ketobutyrat 6mM	40	stationär
K_2-lt-5c/Ace 10 (PPS^+,PDH^-,Icl^c)	Na-Acetat 38mM	-	9	logarithmisch
		-	11	stationär
		K-α-Ketoisovaleriat 6mM	20	stationär
		K-α-Ketoisocaproat 6mM	10	stationär
Ace 10 (PPS^-, PDH^-)	Na-Acetat 38mM	-	7	stationär
		Na-Pyruvat 6mM	37	stationär
		K-α-Ketovaleriat 6mM	27	stationär
		K-α-Ketocaproat 6mM	15	stationär
		K-α-Ketononanoat 6mM	13	stationär
		K-α-Ketodecanoat 6mM	9	stationär

verzweigten α-Ketosäuren kann folgende Aussage gemacht werden. Die α-Ketoisovaleriansäure besitzt noch induzierende Wirkung, gegenüber derjenigen der unverzweigten C_5-α-Ketosäure ist sie schon deutlich herabgesetzt. Im Fall der α-Ketoisocapronsäure resultiert die Verzweigung der Kette in einem vollständigen Verlust der induzierenden Aktivität, während die geradkettige α-Ketocapronsäure noch eine meßbare induzierende Aktivität besitzt.

k) Versuche über die Aufnahme von Pyruvat und α-Ketooctanoat in ruhenden Zellen

Die Aussage über die Abhängigkeit der induzierenden Aktivitäten von der Zahl der Kohlenstoffatome der α-Ketosäuren könnte angezweifelt werden. Nicht die Kettenlänge der α-Ketosäure mag die induzierende Aktivität bestimmen, sondern die abnehmende Fähigkeit der Zelle, Induktoren steigender Kettenlänge in ausreichender Konzentration in das Zellinnere zu transportieren. Das Absinken der maximalen spezifischen Aktivitäten der Komponente E1 ist dann nicht mit den spezifischen Eigenschaften der α-Ketosäuren als Induktoren verknüpft. Man könnte also annehmen, daß die längerkettigen α-Ketosäuren gleiche induzierende Aktivitäten entfalten wie die Brenztraubensäure. Jedoch widerlegten Versuche mit Zellsuspensionen der Mutanten Ace 10 (PPS^+, PDH^-) und AB 287/Ace 10 (PPS^+, PDH^-) diese Annahmen. In Abb. 11 wurde in Phosphatpuffer suspendierten Zellen des Stammes Ace 10 Pyruvat zum Zeitpunkt 0 zugefügt. Nach 7, 5, 15 und 30 Minuten wurde die Pyruvat-Konzentration der Suspension bestimmt. Nach 5 Minuten waren etwa 7 µMole Pyruvat von den Zellen aufgenommen. Die Aufnahme der α-Ketooctansäure, deren induzierende Aktivität in Tab. 9 belegt wurde, demonstriert Abb. 12.

Die Zellsuspension (A) des Stammes AB 287/Ace 10 wurde in gleicher Konzentration verwendet wie im Experiment für die Pyruvataufnahme. Allerdings mußte eine wesentlich niedrigere Konzentration der α-Ketooctansäure bei Inkubationsstart

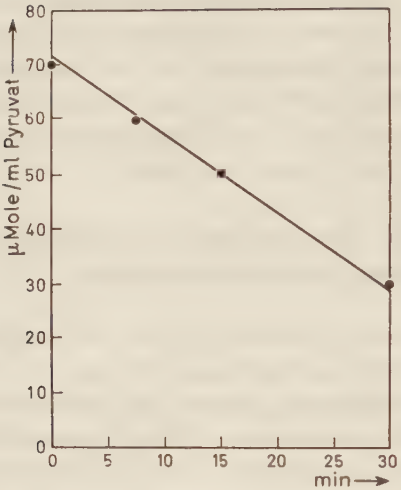


Abb. 11 Pyruvataufnahme durch eine Zellsuspension der Mutante Ace 10 (PPS^+, PDH^-).

Die Zellen wurden nach Wachstum des Stammes auf Glucose (28 mM) unter Acetatzusatz (4 mM) bei einer Konzentration von $7x10^8$/ml geerntet, einmal in 0,1 M K-Phosphatpuffer gewaschen und erneut in 0,1 M K-Phosphatpuffer bei 37^oC zu einer Zellzahl von $6x10^{11}$/4 ml suspendiert und 2 h belüftet. Danach wurden zur Zeit 0 70 µMole/ml Pyruvat zugefügt und nach verschiedenen Zeiten die Abnahme der Pyruvat-Konzentration gemessen (s.meth.Teil).

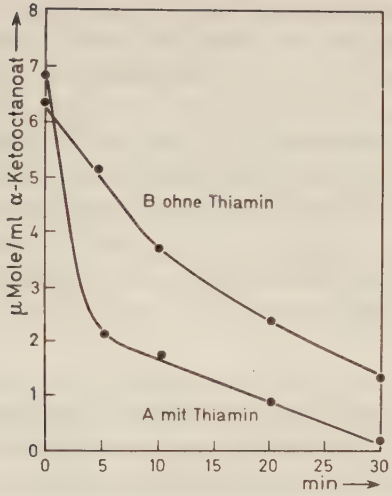


Abb. 12 α-Ketooctanoataufnahme einer Zellsuspension (A) des Stammes AB 287/Ace 10 (Thi^-, PDH^-) und der (B) des Stammes AB 287 (Thi^-, PDH^+)

In beiden Fällen wurden $6x10^{11}$ Zellen in 2,5 ml 0,1 M K-Phosphatpuffer bei 37^oC suspendiert und zum Zeitpunkt 0 etwa 7 µMole/ml α-Ketooctanoat zugefügt und nach verschiedenen Zeiten die Abnahmen der Konzentrationen der α-Ketosäure gemessen (s.meth.Teil).
Die Zellen des Stammes AB 287/Ace 10 (Thi^-, PDH^-) wurden nach Wachstum auf Glucose (28mM) unter Zusatz von 1 µg/ml Thiamin und Vitamin-freien Casaminosäuren (0,05%) bei einer Konzentration von $1x10^9$/ml geerntet. Nach Zentrifugation und einmaligem Waschen der Zellen in 0,1 M K-Phosphatpuffer pH 7,0 wurden diese erneut zentrifugiert und in frischem 0,1 M K-Phosphatpuffer suspendiert. Die Zellen des Stammes AB 287 (Thi^-, PDH^-) wurden nach Wachstum auf Glucose (28 mM) unter Zusatz von Vitamin-freien Casaminosäuren (0,05%) in gleicher Weise behandelt.

eingesetzt werden. Höhere Konzentration der α-Ketooctansäure als 6-7 µMole/ml wie auch die der nachfolgenden homologen α-Ketononansäure und α-Ketodecansäure wirkten in ihren K-Salzen dann offenbar als starke Detergenzien, die Zellen lysierten. Der Verlauf der α-Ketooctanoat-Aufnahme zeigt, daß innerhalb von 5 Minuten etwa 5 µMole aus dem Inkubationsansatz in die Zellen gelangten. Manometrische Messungen ergaben, daß der Eintritt der α-Ketosäure in die Zellen mit einer Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxid-Freisetzung verbunden war.

Die für diese Reaktion verantwortliche decarboxylierende Aktivität kann nicht der Komponente E1 der PDH zugeschrieben werden. Die α-Ketooctansäure wird von dieser nicht umgesetzt, wie die noch folgenden Untersuchungen zeigen. Die oxidative Decarboxylierung der α-Ketooctansäure konnte auf die Pyruvat-Oxidase zurückgeführt werden (s. Anhang).

1) Umsetzung von α-Ketosäuren mit einer angereicherten PDH

Da eine Reihe von Pyruvat-Analogen induzierende Aktivität besitzt, konnte geprüft werden, ob zwischen den Eigenschaften einer α-Ketosäure als Substrat für das Enzym und als Induktor seiner Synthese zu dienen, unterschieden werden kann. Tab. 11 macht deutlich, daß die induzierende Eigenschaft einer α-Ketosäure keine Substrateigenschaft zur Voraussetzung hat.

α-Ketononanoat entfaltet induzierende Aktivität (Tab. 9 und 10). Jedoch kann es nicht als Substrat in der Modellreaktion dienen, die von der Komponente E1 der Pyruvatdehydrogenase katalysiert wird. Diese führt die oxidative Decarboxylierung der α-Ketosäuren unter Übertragung der Elektronen auf die künstlichen Acceptoren Ferricyanid oder 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCIP) durch. α-Ketoisocaproat

hingegen wurde mit DCIP als Elektronenacceptor im Enzym-Test noch umgesetzt (Tab. 11). Doch besitzt diese verzweigte α-Ketosäure gar keine induzierende Aktivität (Tab. 10).

Die Resultate des ersten und zweiten Abschnittes zeigen, daß Phosphoenolpyruvat, Citrat, Acetat oder ein naher Abkömmling desselben keine Effektoren der PDH-Synthese sind.

Pyruvat und einige seiner längerkettigen verzweigten und unverzweigten Analogen wirken als extrazelluläre Induktoren der PDH-Synthese.

Die Abnahme der induzierenden Aktivität von α-Ketosäuren bis zum gänzlichen Verlust dieser Eigenschaft (C_{10}-α-Ketosäure, verzweigte C_6-α-Ketosäure) beruhen nicht auf einer Permeabilitätsschranke der Zellen für diese Pyruvat-Analogen.

Diese Ergebnisse erlauben jedoch noch keine Aussage über folgende Punkte:

1. Ob Pyruvat nur als metabolischer Vorläufer des Effektors zu betrachten ist.

2. Ob Pyruvat hemmend oder aktivierend auf andere Stoffwechsel-Reaktionen wirkt. Deren Substrate oder Produkte könnten dann den induzierenden oder vielleicht reprimierenden Effektor darstellen.

3. Ob Pyruvat direkt wirkt und ihm somit die Doppelrolle des Substrates und induzierenden Effektors zukommt.

Tabelle 11 Umsetzung von α-Ketosäuren mit einer angereicherten Pyruvatdehydrogenase (s. meth. Teil).

Substrat	Sp.A.d.PDH mit Ferricyanid als Elektronenacceptor	Sp.A.d.PDH mit Dichlorphenolindophenol als Elektronenacceptor
Na-Pyruvat	91	9
K-α-Ketobutyrat	36	9
K-α-Ketovaleriat	1,5	2
K-α-Ketoisovaleriat	keine Umsetzung	0,15
K-α-Ketocaproat	" "	0,5-1
K-α-Ketoisocaproat	" "	0,03
K-α-Ketooctanoat	" "	keine Umsetzung
K-α-Ketononanoat	" "	" "
K-α-Ketodecanoat	" "	" "

3. Evidenz gegen die Rolle des Pyruvates als metabolischer Vorläufer des Effektors

a) Ausschluß von Hydroxyäthyl-TPP, Acetolactat und den Vorläufern der Leucin, Isoleucin und Valin-Biosynthesen als Effektoren der PDH-Synthese

In allen vorangehenden Induktionsstudien mit den verschiedenen Mutanten ist die Komponente E1 der Pyruvatdehydrogenase anwesend. Durch sie kann Pyruvat in allen verwendeten Mutanten in den Reaktionen (7, 8) zu Hydroxyäthyl-TPP und zu Acetolactat (38) verwandelt werden.

7. Pyruvat + TPP-E1 ⟶ CO_2 + Hydroxyäthyl-TPP-E1

8. Hydroxyäthyl-TPP-E1 + Pyruvat ⟶ Acetolactat + TPP-E1

Die für Pyruvat beschriebenen Reaktionen laufen auch in analoger Weise für α-Ketobutyrat als Substrat ab.

Um diese mögliche Rolle des Pyruvates als metabolischer Vorläufer des induzierenden Effektors zu widerlegen, kann auf Stämme mit defekter Komponente E1 (Missense-Mutationen) ausgewichen werden. Die unversehrte Komponente E2 der Mutanten kann dann auf ihre Induzierbarkeit durch Pyruvat getestet werden. Jedoch stellte sich heraus, daß die Mutanten katalytische Aktivität in der Reaktion (7) besitzen. Ihr Defekt muß im Verlust der Reaktion (3) (s. Einleitung) bestehen. Daher mußte in anderer Weise versucht werden, die Umsetzung des Pyruvates an der katalytisch aktiven Komponente E1 zu verhindern. Der Thiamin auxotrophe Stamm AB 287 (Thi^-) kann unter bestimmten Wachstumsbedingungen in Medien ohne Thiamin gezüchtet werden. Sein Thiaminbedürfnis überkommt man durch Zusatz von vitaminfreien Casaminosäuren.

In Minimal-Medien mit Glucose als C-Quelle und unter Zusatz der Casaminosäuren wächst der Stamm zu etwa 50-70% der Zellkonzentration, die er in Gegenwart von Thiamin erreicht. Unter diesen Bedingungen wird erwartungsgemäß Pyruvat

Tabelle 12 Effekt des Wachstums auf verschiedenen Kohlenstoffquellen mit und ohne Thiamin auf die Synthese der Pyruvatdehydrogenase im Stamm AB 287 (Thi^-).

Kohlenstoffquelle	Thiamin 1 µg/ml	Sp. A. d. PDH mit TPP im Test	Sp. A. d. PDH ohne TPP im Test	akkum. Pyruvat µMole/ml
Glucose, 20mM	+	25	18	<0,01
Glucose, 20mM	-	80	<0,1	>5
Na-Pyruvat, 50mM	+	60		
Na-Acetat, 35mM	+	8	8	<0,01
Na-Acetat, 35mM	-	<0,1	13	<0,01

akkumuliert (Tab. 12). Die Messung der spezifischen Aktivität der Pyruvatdehydrogenase in diesen Zellen demonstrierte die vollständige Inaktivität des Enzymes in Abwesenheit von TPP. Wurde dieser Cofaktor in den Enzym-Test gegeben, so maß man sehr hohe spezifische Aktivitäten. Es wurde aber bezüglich des TPP reines Apoenzym gebildet. Die Werte lagen sogar höher als die Werte der spezifischen Aktivitäten des Enzymes nach Wachstum auf Pyruvat unter Thiaminzusatz. Dagegen lieferten Zellen der Mutante nach Wachstum auf Glucose mit Thiamin normale Mengen PDH mit und ohne Zugabe von TPP im Enzym-Test. Pyruvatausscheidung in das Medium wurde nicht beobachtet (Tab. 12). Führte man die geschilderten Experimente unter den gleichen Bedingungen mit Acetat als Kohlenstoffquelle durch, so unterblieb in Abwesenheit von Thiamin die Pyruvatakkumulation. Die Pyruvatdehydrogenase im Rohextrakt der Zellen ohne Thiaminzusatz erwies sich im Enzym-Test ohne TPP als katalytisch inaktiv. Jedoch lieferte die Messung der spezifischen Aktivität nach TPP-Zusatz in diesem Rohextrakt solche Werte, die Zellen auch nach Wachstum in Acetat unter Thiaminzusatz besaßen. Dies demonstriert klar, daß nicht der Mangel an Thiamin für die hohe Synthese der PDH verantwortlich ist, sondern die hohe intrazelluläre Pyruvat-Konzentration muß die Induktion der Pyruvatdehydrogenase-Synthese bewirken. Diese Experimente schließen zugleich Hydroxyäthyl-TPP und Acetolactat einschließlich seiner Abkömmlinge (Abb. 5) als induzierende Effektoren aus, denn ohne TPP ist ihre Bildung und damit Wirkung nicht möglich.

b) Demonstration des Gen-Dosis-Effektes für die PDH-Synthese in Abhängigkeit hoher intrazellulärer Pyruvat-Konzentrationen in merodiploiden Stämmen

Weitere Versuche mit merodiploiden Stämmen bewiesen, daß für eine maximale Induktion der Synthese der Pyruvatdehydrogenase eine hohe intrazelluläre Pyruvat-Konzentration erforderlich ist.

Wachstum der Mutante Ace 10 (3 in Tab. 13) auf Glucose unter Zusatz von Acetat resultierte in einer Pyruvatakkumulation. Die nicht komplexgebundene Komponente E1 lieferte in solchen Experimenten hohe spezifische Aktivitäten, deren Werte (Tab. 13) zwischen 70 und 90 schwankten. Wuchs die Homogenote Ace 10/F'_{TS} ECO5 ace 10 (4) unter den gleichen Bedingungen, so schied auch sie Pyruvat in das Medium aus. Ihr Genotyp setzte sich aus der chromosomalen Strukturgenregion $E1^+E2^-E3^+$ und der zweiten gleichen Strukturgenregion zusammen, die das Episom F'_{TS} ECO5 ace 10 trug. Synthese der Komponente E1 beider Strukturgene erfolgte gleichermaßen. Ihrer genetischen Konstitution entsprechend lieferte sie spezifische Aktivitäten der Komponente E1 zwischen 170 und 190 und demonstrierte klar einen Gen-Dosis-Effekt. Im Gegensatz zu diesem Resultat stand das Verhalten der Homogenote Wildtyp/F'_{TS} ECO5 (2) mit dem Genotyp $E1^+E2^+E3^+F'E1^+E2^+E3^+$. Der erwartete Gen-Dosis-Effekt nach Wachstum auf Glucose blieb aus. Wurde der Homogenoten Pyruvat als Kohlenstoffquelle angeboten, so antwortete sie mit einer erhöhten Synthese der Pyruvatdehydrogenase. Jedoch war die gebildete Enzym-Menge nicht höher als die des haploiden Wildtypes (1) auf der gleichen Kohlenstoffquelle. Dagegen zeigte die Heterogenote Wildtyp/F'_{TS} ECO5 ace 10 (5) nach Wachstum in Glucose oder Pyruvat wieder einen Gen-Dosis-Effekt. Gemäß ihrem Genotyp $E1^+E2^+E3^+F'E1^+E2^-E3^+$ produzierte sie Pyruvatdehydrogenase vom Wildtyp-Charakter und die freie Komponente E1. Allerdings entsprach der Gen-Dosis-Effekt nicht dem der Homogenoten Ace 10/F'_{TS} ECO5 ace 10 (4).

Die PDH und die freie Komponente E1 wurden nur in solchen Mengen produziert, die bei haploiden (1) und diploiden (2) Wildtypen anzutreffen waren. Das Ausmaß der Synthese der Komponente E1 wurde von der produzierten PDH-Menge beeinflußt. Beide waren in annähernd gleicher Menge vorhanden. Der diploide Stamm Ace 10/F'_{TS} ECO5 (6) mit der umgekehrten genetischen Konstitution zeigte das gleiche Ergebnis. Für

Tabelle 13 Effekt des Wachstums auf Kohlenstoffquellen mit und ohne Thiamin auf die Synthese der Pyruvatdehydrogenase und ihrer Komponente E1 in haploiden und merodiploiden Stämmen.

	Stamm	Genotyp	Kohlenstoffquelle	Thiamin 1µg/ml	akkum.Pyruvat µMole/ml	Spezifische Aktivitäten PDH	E1	PDH	E1
1.	Wildtyp	$E1^+E2^+E3^+$	Glucose 20mM	+	<0,01	20- 30			
			Na-Pyruvat 50mM	+		50- 60			
			Glucose 20mM	-	>5	70- 90			
2.	Wildtyp/ $F'_{TS}EC05$	$E1^+E2^+E3^+$/ $F'E1^+E2^+E3^+$	Glucose 20mM	+	<0,01	20- 30			
			Na-Pyruvat 50mM	+		50- 60			
			Glucose 20mM	-	>5	170-190			
3.	Ace 10	$E1^+E2^-E3^+$	Glucose 20mM	+	>5		70-90		
			Glucose 20mM	-	>5		70-90		
4.	Ace 10/ $F'_{TS}EC05$ace 10	$E1^+E2^-E3^+$/ $F'E1^+E2^-E3^+$	Glucose 20mM	+	>5		170-190		
			Glucose 20mM	-	>5		170-190		
5.	Wildtyp/ $F'_{TS}EC05$ace 10	$E1^+E2^+E3^+$/ $F'E1^+E2^-E3^+$	Glucose 20mM	+	<0,01			20-30	20-30
			Na-Pyruvat 50mM	+				50-60	50-60
			Glucose 20mM	-	>5			80	90
6.	Ace 10/ $F'_{TS}EC05$	$E1^+E2^-E3^+$/ $F'E1^+E2^+E3^+$	Glucose 20mM	+	<0,01			20-30	20-30
			Na-Pyruvat 50mM	+				50-60	50-60
			Glucose 20mM	-	>5			80	90

die Synthese der Komponente E1 war jetzt die Strukturgenregion auf dem Chromosom verantwortlich, während die Strukturgenregion für die komplette PDH episomaler Herkunft war. Die Aufklärung des unterschiedlichen Verhaltens der diploiden Stämme hinsichtlich der Synthese der Pyruvatdehydrogenase und der Komponente E1 lieferten folgende Experimente. Wuchs die thiaminbedürftige Homogenote Wildtyp/F'_{TS} EC05 (2) in Glucose ohne Thiamin, so schied sie Pyruvat in das Medium aus (Tab. 13). Die Messung der spezifischen Aktivität der PDH zeigte den erwarteten Gen-Dosis-Effekt an, der bei Wachstum in Glucose mit Thiamin ausblieb. Genauso verhielten sich unter den gleichen Bedingungen die Heterogenoten Wildtyp/F'_{TS} EC05 ace 10 (5) und Ace 10/F'_{TS} EC05 (6). Sie akkumulierten Pyruvat und besaßen eine voll induzierte Pyruvatdehydrogenase und Komponente E1.

In allen Fällen erwiesen sich bei Wachstum ohne Thiamin die Pyruvatdehydrogenase und die Komponente E1 in den Rohextrakten als katalytisch inaktiv.

Solange katalytisch aktive PDH vorhanden ist, erreicht also die intrazelluläre Pyruvat-Konzentration auch bei Wachstum auf Pyruvat als Kohlenstoffquelle nicht das Niveau, um volle Induktion der Enzym-Synthese zu bewirken. Ausfall der katalytischen Aktivität durch Mutation oder katalytische Inaktivität infolge TPP-Mangels sind erforderlich, um eine genügend hohe intrazelluläre Pyruvat-Konzentration für die volle Induktion der Enzym-Synthese zu erzielen. Jedoch könnten die Ergebnisse in Tab. 13 auch mit der Bildung eines reprimierenden Effektors aus Pyruvat erklärt werden. In Kenntnis der Versuche mit der Tripel-Mutanten K_2-lt-5c/Ace 10 kann diese Erklärung nicht zutreffen (Abb. 9).

Die Daten des 3. Abschnittes zeigen eindeutig, daß Hydroxyäthyl-TPP und Acetolactat als induzierende Effektoren nicht in Frage kommen. Mit dieser Eliminierung sind zugleich sämtliche TPP-abhängigen Reaktionen in der Zelle als Lieferanten von Effektoren ausgeschaltet.

Die merodiploiden Stämme demonstrieren, daß eine maximale Pyruvatdehydrogenase-Synthese katalytische Inaktivität des Enzymes verlangt, um die erforderliche hohe intrazelluläre Induktor-Konzentration zu erreichen.

4. Evidenz gegen eine indirekte Wirkung des Pyruvates

a) Messungen einiger Phosphor-32 markierter Zwischenstufen der Glykolyse in Wildtypen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

Die bisher geschilderten Daten sprechen zwar stark gegen eine indirekte Wirkung des Pyruvates, räumen aber nicht gänzlich den Einwand über seine mögliche indirekte Rolle aus. Pyruvat könnte z. B. eine stimulierende oder hemmende Wirkung auf eine Reaktion der glykolytischen Sequenz entfalten. Das Substrat oder Produkt dieser Reaktion würde dann den Effektor für die Synthese der PDH stellen. Um diesen Einwand auszuschließen, wurden Experimente aufgrund folgender Beobachtungen und Annahmen durchgeführt. Bei Wachstum unter strikter Anaerobiosis auf Glucose einerseits und unter starker Belüftung auf Acetat andererseits synthetisierten Wildtypzellen etwa gleiche Mengen an Pyruvatdehydrogenase (Tab. 1). Sollte eine der Zwischenstufen der Glykolyse in Gestalt der phosphorylierten Hexosen als Effektor wirken, so muß man annehmen, daß die Zwischenstufe in gleicher Konzentration unter den verschiedenen Wachstumsbedingungen vorliegen muß. Im Fall des anaeroben Glucoseabbaues stellt die Glykolyse den energieliefernden Stoffwechselweg dar. Mithin sollte man hohe Konzentrationen ihrer Zwischenstufen in der Zelle vermuten. Während im Gegensatz dazu bei Wachstum auf Acetat unter aeroben Bedingungen der Citronensäure-Cyclus als Energie-Lieferant dient und die Glykolyse nur in ihrer Biosynthese-Funktion benötigt wird. Daher mögen die glykolytischen Zwischenstufen in wesentlich geringeren Konzentrationen vorliegen als bei anaerobem Glucoseabbau.

Träfe diese Spekulation zu, müßten diese Zwischenstufen als fragliche Effektoren ausscheiden und damit auch diese indirekte Wirkung des Pyruvates.

Zur Messung herangezogen wurden die Zwischenstufen Glucose-1-phosphat, Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat und Fructose-1-6-diphosphat. Phosphogluconat wurde als Vertreter des Pentosephosphat-Cyclus in die Versuche einbezogen.

Die erforderliche Suche nach Trennmethoden für die 5 Substanzen gestaltete sich aufwendig. Beschriebene Methoden für die Dünnschicht-Chromatographie der Zuckerphosphate lieferten keine befriedigenden Ergebnisse. Die Literatur über die Papier-Chromatographie der Zuckerphosphate enthält zwar zahlreiche Angaben, es wurden aber mit den angegebenen Laufmittel-Systemen keine ausreichenden Trennungen der 5 Komponenten erzielt. Daher war es notwendig, günstige Kombinationen von Laufmitteln aus bekannten Trennsystemen zu erproben. Befriedigende Resultate ergab die Anwendung des in Abb. 13 dargestellten Laufmittel-Systemes.

Jedoch lieferten Radioautographien der Papier-Chromatogramme, in denen die 5 Phosphor-32 markierten Zuckerphosphate aus Salzsäureextrakten der Wildtypzellen voneinander getrennt wurden, nicht das erwartete Bild. Die Auswertung der Papier-Chromatogramme zeigte, daß anaerob wachsende Zellen mit Glucose als Kohlenstoffquelle nicht wesentlich höhere intrazelluläre Konzentrationen von Glucose-1-P, Glucose-6-P und Fructose-1-6-P aufwiesen als aerob wachsende Zellen mit Acetat als Kohlenstoffquelle. Die drei Hexophosphate wiesen eine nur sehr geringe Markierung auf.

Fructose-6-phosphat besaß unter beiden Wachstumsbedingungen keine Markierung. Nur Phosphogluconat wies eine deutlich höhere Markierung auf als nach aerobem Wachstum der Zellen auf Acetat.

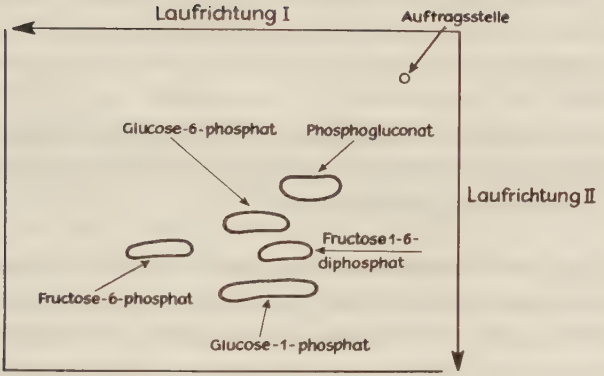


Abb. 13 Zweidimensionale Papier-Chromatographie der Zuckerphosphate (s.meth.Teil).

Laufmittel für Laufrichtung I : 96% Äthanol, 88% Ameisensäure und Aqua dest. = 80/15/5 (V/V)
Laufmittel für Laufrichtung II: 96% Äthanol, 0,1 M Ammoniumtetraborat pH 10 = 3/2 (V/V).

Da unter diesen Wachstumsbedingungen gleiche Mengen PDH in den Wildtypen produziert wurden, schied Phosphogluconat mit Sicherheit als Effektor aus. Für die verbleibenden 4 Hexosephosphate ist diese Aussage nicht möglich. Es kann ihnen vorerst nicht abgesprochen werden, als induzierende oder reprimierende Effektoren der PDH-Synthese zu wirken. Mit folgenden Experimenten wurde versucht, ihre regulatorische Wirkungslosigkeit eindeutig zu zeigen.

b) PDH-Synthese in der Mutante h8 mit Temperaturempfindlicher Fructose-1-6-diphosphat-Aldolase bei verschiedenen Temperaturen

Erwünscht für derartige Experimente war ein Stamm mit einem partiellen Block in der Glykolyse, der Wachstum auf Glucose als Kohlenstoffquelle noch zuließ. Der Abbau der Glucose in dieser Mutante mit gestörter Glykolyse könnte in einer erhöhten Konzentration der Zwischenstufe resultieren, die als Substrat für das defekte glykolytische Enzym dient. Die vorgeschalteten Zwischenstufen könnten dann gleichfalls in erhöhten Konzentrationen vorliegen. Würde dagegen diese Mutante auf einer Kohlenstoffquelle wie Succinat oder Acetat wachsen, benötigt sie die Glykolyse nur in ihrer biosynthetischen Funktion. Keinesfalls können die Zwischenstufen in den Konzentrationen vorliegen, die bei Abbau der Glucose entstehen.

Eine Mutante von E. coli K 12 mit den geforderten Eigenschaften ist bekannt (39). Der Stamm h8 besitzt eine Temperaturempfindliche Fructose-1-6-diphosphat-Aldolase (Fruc-1-6-P-A). Wachstum in Glucose bei 30°C geht wie bei dem Wildtyp vonstatten.

Dagegen wird bei 40°C das Zellwachstum durch Glucose vollständig gehemmt. Mit dem Abbau der Glucose bei dieser Temperatur ist eine Gluconatabgabe in das Medium verknüpft. Der Hemmeffekt durch Glucose bei 40°C beruht auf dem katalytischen Ausfall der Fruc-1-6-P-A. Die Folge ist ein Anstau des

Fructose-1-6-diphosphates in der Zelle und seiner phosphorylierten Vorläufer. Glucose-1-phosphat ist bei Wachstum der Zellen in 30°C auf Glucose nicht nachweisbar, während es bei 40°C in meßbaren Konzentrationen erscheint (40). Die hohen intrazellulären Konzentrationen der Hexosephosphate wirken dann toxisch.

Im Gegensatz zu Glucose liefert Succinat als Kohlenstoffquelle bei 40°C keine Hemmung des Zellwachstums und somit keinen Anstau von Hexosephosphaten. Wachstum auf dieser Kohlenstoffquelle erfordert jedoch Gluconeogenese. In der Mutante h8 muß daher die Aldolbildende Fähigkeit der defekten Fruc-1-6-P-A bei 40°C noch ausreichend vorhanden sein, um Wachstum auf dieser Kohlenstoffquelle zu ermöglichen. Eine gänzliche Inaktivität des defekten Enzymes tritt bei 42°C auf, die Mutante kann dann auch Succinat nicht mehr als Kohlenstoffquelle verwerten.

Zur Prüfung des Einflusses unterschiedlicher Hexophosphat-Konzentrationen auf die PDH-Synthese in der Mutante h8 kann die Züchtungstemperatur von 40°C nicht verwendet werden. Der Hemmeffekt der angestauten Hexosephosphate bei Glucoseabbau führt zum Wachstumsstillstand. Daher wurde diejenige Züchtungstemperatur ermittelt, bei der der Hemmeffekt der angestauten Hexosephosphate nicht ein solches Ausmaß erreichte, um das Zellwachstum vollständig zu unterbinden. Aus Abb. 14 wird ersichtlich, daß die Mutante h8 (A) gegenüber ihrer Revertante (B) mit Temperatur-unempfindlicher Fruc-1-6-P-A bei 35°C eine Verlangsamung der Generationszeit um den Faktor 10 aufwies. Die spezifische Aktivität der Pyruvatdehydrogenase in der Mutante h8 zeigte nach Wachstum auf Glucose bei 35°C einen deutlich niedrigen Wert (Tab. 14). Dagegen wurde nach Züchtung der Zellen auf Glucose bei 30°C der übliche Wert für diese Kohlenstoffquelle gemessen. Succinat wiederum lieferte als Kohlenstoffquelle bei 35°C eine hohe spezifische Aktivität der PDH. Nach Wachstum bei 30°C traf man für Succinat jedoch eine niedrigere spezifische Aktivität der PDH an.

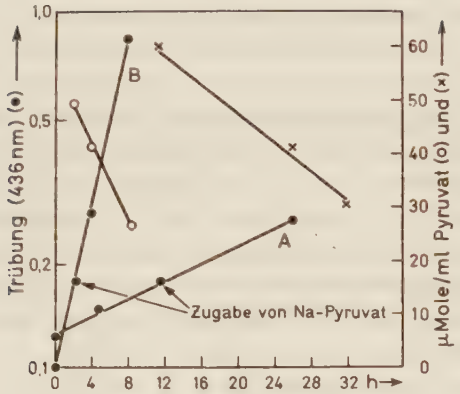


Abb. 14 Wachstum der Mutante h8 (A) und ihrer Revertante (B) auf Glucose (28 mM) bei 35°C und Messung des Pyruvatverbrauches (x) von A und des (o) von B.

Tabelle 14 Spezifische Aktivitäten der Pyruvatdehydrogenase der Mutante h8 nach Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen bei verschiedenen Temperaturen; Effekt von Pyruvat auf die PDH-Synthese.

Kohlenstoffquelle	Wachstumstemperatur	Zugabe von Pyruvat µMole/ml	Sp.A.d.PDH
Glucose 22mM	30°C	-	21
Glucose 22mM	35°C	-	14
Glucose 22mM	35°C	60	29
Na-Pyruvat 46mM	35°C	-	78
Na-Acetat 38mM	35°C	-	12
K-Succinat 26mM	30°C	-	21
K-Succinat 26mM	35°C	-	27

Schließlich lieferte Pyruvat als C-Quelle bei 35°C volle Induktion der Enzym-Synthese. Eine einleuchtende Erklärung für dieses Verhalten der PDH (Tab. 14) könnte in der reprimierenden Wirkung eines Hexosephosphates auf die Synthese des Enzymes bestehen. Bei 35°C und dem dabei eintretenden katalytischen Defekt der Fructose-1-6-diphosphat-Aldolase läge der reprimierende Effektor in erhöhter Konzentration bei Abbau der Glucose vor. Dies hätte eine erniedrigte PDH-Synthese zur Folge. Bei 30°C besitzt die Mutante h8 katalytisch aktive Fruc-1-6-P-A. Ihr Glucoseabbau führt nicht zu einer solchen Konzentration des reprimierenden Effektors in Gestalt eines Hexosephosphates, die eine erniedrigte Enzym-Synthese bewirken kann. Daher wäre das Verhalten der Pyruvatdehydrogenase nach Wachstum auf Succinat bei 35°C verständlich. Bildung des reprimierenden Effektors ist nur auf dem Wege der Gluconeogenese über die defekte Fructose-1-6-diphosphat-Aldolase möglich. Bei 30°C arbeitet dieses Enzym normal, und die Bildung des reprimierenden Effektors kann ausreichend vonstatten gehen. Dementsprechend wird eine verminderte spezifische Aktivität der PDH gemessen. Aufgrund dieser Überlegungen erklärte sich dann auch das Verhalten der PDH nach Wachstum der Mutante auf Pyruvat als C-Quelle. Zur Widerlegung der möglichen Wirkung eines Hexosephosphates als reprimierender Effektor der Pyruvatdehydrogenase wurde folgendes Experiment ausgeführt. Exponentiell wachsende Zellen der Mutante h8 auf Glucose bei 35°C häufen Hexosephosphate und damit den fraglichen reprimierenden Effektor an. Bietet man diesen Zellen Pyruvat an, so sollte man bei regulatorischer Wirkungslosigkeit der Hexosephosphate und vielleicht unbeschadet ihrer schon zellschädigenden Konzentrationen eine erfolgreiche Induktion der PDH erwarten.

Jedoch zeigte (Tab. 14) dieses Experiment nicht das erwartete Ergebnis. Die Mutante h8 lieferte nur eine geringe Erhöhung der spezifischen Aktivität der Pyruvatdehydrogenase nach Zugabe von Pyruvat zu Glucose-abbauenden Zellen bei 35°C. Die volle Induktion der Enzym-Synthese wurde nicht erreicht.

Sollte dieses Experiment die reprimierende Wirkung eines Hexosephosphates stützen, so muß ein möglicher Verdacht entkräftet werden. Die nur geringe Erhöhung der spezifischen Aktivität der PDH nach Zugabe des Pyruvates mag nicht auf der spezifischen Wirkung eines Hexosephosphates als reprimierenden Effektor, sondern auf den Auswirkungen des gestörten Glucoseabbaues beruhen. Der Eintritt des Pyruvates in die Zellen der Mutante bei 35°C während des Glucoseabbaues könnte so erschwert sein, daß eine ausreichende Induktor-Konzentration nicht entstehen kann, zumal die katalytisch aktive Pyruvatdehydrogenase für eine sofortige Umsetzung des Pyruvates in der Zelle sorgt. Abb. 14 demonstriert, daß die Aufnahme des Pyruvates in der Mutante h8 während des Glucoseabbaues bei 35°C um den Faktor 3 langsamer geschah als in der Revertante mit katalytisch aktiver Fruc-1-6-P-A unter den gleichen Bedingungen. Daher bewies ein erfolgloses Induktionsexperiment mit der Mutante h8 nicht die reprimierende Wirkung eines Hexosephosphates. Den entscheidenden Einwand gegen die Rolle eines Hexosephosphates als reprimierender Effektor lieferte folgendes Experiment.

Wuchsen Zellen der Mutante auf Acetat als Kohlenstoffquelle bei 35°C, so stimmte ihr Wachstumsverhalten trotz der defekten Fruc-1-6-P-A mit dem der Revertante mit katalytisch aktivem Enzym völlig überein. Da die intrazellulären Hexosephosphat-Konzentrationen auf dieser Kohlenstoffquelle wesentlich kleiner sein müssen als auf Glucose bei 35°C, so ist bei tatsächlich reprimierender Wirkung eines Hexosephosphates eine hohe spezifische Aktivität der PDH zu erwarten. Tab. 14 zeigt, daß dies nicht der Fall war. In Gegenwart hoher Konzentrationen der Zwischenstufen der Glykolyse wurde die gleiche spezifische Aktivität der PDH gemessen wie in Gegenwart ihrer Zwischenstufen mit kaum meßbaren Konzentrationen. Daher leuchtet eine mögliche indirekte Wirkung des Pyruvates auf die Synthese der PDH mit Hilfe eines Zwischenproduktes der Glykolyse nicht ein. Ferner erwiesen sich die produzierten Mengen PDH in der Mutante h8 nach Wachstum auf Succinat bei 30°C und 35°C als spezifisch

für die Mutante h8. Die Revertante (Tab. 15) lieferte nach Wachstum in Succinat bei 30°C und 39°C etwa die gleichen Pyruvatdehydrogenase-Mengen.

Die Ergebnisse mit der Mutante h8 sprechen eindeutig gegen eine völlig indirekte Wirkung des Pyruvates. Die Resultate des ersten und zweiten Abschnittes zeigen, daß aus Pyruvat kein reprimierender Effektor gebildet wird. Im dritten Abschnitt werden hinreichende Evidenzen gebracht, die gegen die Rolle des Pyruvates als metabolischer Vorläufer des induzierenden Effektors sprechen. Insgesamt machen es die Daten daher höchstwahrscheinlich, daß Pyruvat selbst den induzierenden Effektor darstellt. Mit welchem Produkt Pyruvat in Wechselwirkung tritt, ist unbekannt. Eine hypothetische Möglichkeit zieht die Pyruvatdehydrogenase als direkte Zielscheibe des Effektors Pyruvat in Betracht. Die nachfolgenden Experimente wurden unter diesem Aspekt durchgeführt.

5. Bindung von 1-^{14}C-Pyruvat und 2-^{14}C-Pyruvat in Rohextrakten von Wildtypen und Mutanten und an angereicherten Pyruvatdehydrogenasen

Bisher wurden 109 unabhängig voneinander isolierte Acetatmangel-Mutanten untersucht. Die Analyse ihrer genetischen Konstitution lieferte ein bemerkenswertes Ergebnis (9).

19 (17%) trugen eine Missense-Mutation im Strukturgen E2, 61 (56%) besaßen diese im Strukturgen E1. Dagegen wurden 29 (28%) als Mutanten vom sogenannten 0°-Typ identifiziert, deren pleiotroper Effekt kaum als extreme Polarisation zu verstehen ist. (Keines der drei Teilenzyme wird mehr synthetisiert.)

16 dieser 0°-Typen konnten als Nonsense-Mutanten bestimmt werden, deren Mutation im Strukturgen E1 liegt. Allein 12 (75%) dieser waren zu 99% polarisiert. Die extreme Häufigkeit von 0°-Typen im E1-Gen des Strukturgen-Komplexes der PDH steht im auffallenden Gegensatz zu Beobachtungen über das Auftreten

Tabelle 15 Spezifische Aktivitäten der Pyruvatdehydrogenase in der Revertante von h8 nach Wachstum auf Glucose und Succinat bei verschiedenen Temperaturen.

Kohlenstoffquelle	Wachstumstemperatur	Zugabe von Pyruvat µMole/ml	Sp.A.d.PDH
Glucose 22mM	30°C	-	28
Glucose 22mM	35°C	-	30
K-Succinat 26mM	30°C	-	21
K-Succinat 26mM	39°C	-	32

extrem polarisierter Nonsense-Mutanten in anderen Enzym-Systemen (41,42). Das ließ daran denken, daß diese Mutanten vom 0^{o}-Typ eine defekte Regulation der PDH-Synthese besitzen. Die Vermutung lag daher nahe, daß die Komponente E1 oder einer ihrer Vorläufer als Zielscheibe für den induzierenden Effektor Pyruvat dienen könnte. Dann ist vielleicht zu erwarten, daß zwei Arten von Bindungsstellen vorhanden sind: erstens ein enzymatisches Wirkungszentrum und zweitens ein regulatorischer Bindungsort. Daher wurde versucht, eine spezifische Bindung des Pyruvates in Rohextrakten und angereicherten PDH-Fraktionen zu demonstrieren. Um Bindung festzustellen, wurde die Methode der Gleichgewichtsdialyse angewandt (s. meth. Teil).

Unerwartet aber eindeutig zeigte sich (Tab. 16), daß Bindung des Pyruvates in Gegenwart von TPP nicht gemessen werden konnte. Wahrscheinlich findet Umsatz zu Hydroxyäthyl-TPP statt, das unter den Bedingungen des Versuches vom Enzym wieder abdissoziiert. Tatsächlich fanden sich in den Versuchen mit TPP oder mit Enzym, das in Abwesenheit von TPP noch 7% seiner vollen Aktivität aufwies, weniger 1-^{14}C-Pyruvat im Dialysenschlauch als außen; d.h. offenbar lief die Decarboxylierung schneller ab als die Diffusion des Substrates zum Gleichgewicht. Bindung des Substrates wurde im Rohextrakt nur mit den weitgehend TPP-freien Proben (s. meth. Teil) gefunden (Tab. 16).

a) Bindung von 2-^{14}C-Pyruvat in Ace 10-Rohextrakt, an angereicherter PDH und an rekonstituiertem Enzym-Komplex

Für eine bessere Beschreibung der Bindung des Pyruvates an das Enzym-Protein sind höhere PDH-Konzentrationen erforderlich. Tab. 17 demonstriert die Bindung des Pyruvates bei verschiedenen Substrat-Konzentrationen mit einer angereicherten PDH-Fraktion. Der Vergleich der Verteilungsverhältnisse der Radioaktivität (I.p.m. von innen zu außen) für die PDH des Rohextraktes (1,94 mg PDH/ml, Tab. 16) und für die Pyruvatdehydrogenase der angereicherten Fraktion (3,8 mg PDH/ml, Tab. 17)

Tabelle 16 Bindung von 1-^{14}C-Pyruvat (4,65 mC/mM) und 2-^{14}C-Pyruvat (3,68 mC/mM) in Rohextrakten aus Wildtypen nach Gleichgewichtsdialysen in 0,1 M K-Phosphatpuffer. Der Rohextrakt mit einer Sp.A. von 100 wurde nach Dialyse gegen 0,1 M K-Phosphatpuffer eingesetzt (s.meth.Teil). Der Rohextrakt mit einer Sp.A. von 105 wurde nach Chromatographie auf Sephadex G200 verwendet (s.meth.Teil).

Protein-Konzentration mg/ml	Sp.A.d.PDH mit TPP i.Test	Sp.A.d.PDH ohne TPP i.Test	PDH-Konzentration mg/ml	Substrat-Konzentration	Zugabe v. TPP bei d. Dialyse	Gleichgewichtsdialyse: Verhältnis der I.p.m. v. innen zu außen
48	100	7	0,96	1-^{14}C-Pyruvat $8,5 \times 10^{-7}$M	+	0,57
48	100	7	0,96	1-^{14}C-Pyruvat $8,9 \times 10^{-7}$M	-	0,65
48	100	7	0,96	2-^{14}C-Pyruvat $1,4 \times 10^{-6}$M	+	0,87
48	100	7	0,96	2-^{14}C-Pyruvat $1,4 \times 10^{-6}$M	-	0,91
88	105	>0,1	1,94	1-^{14}C-Pyruvat $8,5 \times 10^{-7}$M	-	1,90
88	105	>0,1	1,94	2-^{14}C-Pyruvat $6,5 \times 10^{-7}$M	-	2,50
-	-	-	-	1-^{14}C-Pyruvat 10^{-6}M	-	1
-	-	-	-	2-^{14}C-Pyruvat 10^{-6}M	-	1

Tabelle 17 Bindung von 2-^{14}C-Pyruvat (3,68 mC/mM) an eine angereicherte Pyruvatdehydrogenase nach Gleichgewichtsdialyse in 0,1 M K-Phosphatpuffer (s.Meth.Teil).

Protein-Konzentration mg/ml	Sp.A.d.PDH	PDH-Konzentration mg/ml	2-^{14}C-Pyruvat-Konzentration	Gleichgewichtsdialyse: Verhältnis der I.p.m.v. innen zu außen
19	1 000	3,8	$8,4 \times 10^{-7}$ M	4,8
19	1 000	3,8	$1,7 \times 10^{-6}$ M	3,8
19	1 000	3,8	$3,4 \times 10^{-6}$ M	2,7
19	1 000	3,8	$6,8 \times 10^{-6}$ M	1,8

nach der Gleichgewichtsdialyse mit 2-^{14}C-Pyruvat als Substrat zeigt, daß Proportionalität der Bindung zur Enzym-Konzentration besteht. Damit wird ein gutes Argument erbracht, daß tatsächlich Bindung des Pyruvates an die PDH und nicht an irgendeine Protein-Komponente gemessen wird. Bindungsversuche mit einem Rohextrakt der Mutante Ace 10 brachten eine weitere Evidenz für die Bindung des Pyruvates an die PDH.

Die E1-Komponente der Mutante Ace 10 kann von gereinigtem Partial-Komplex E2-E3 zum kompletten Enzym gebunden werden, das in der Gesamtreaktion aktiv ist. Es zeigte sich, daß das nicht gebundene Enzym E1 offenbar in einer konfiguration vorliegt, in der die Affinität zum Pyruvat herabgesetzt ist (Tab. 18). Rekonstitution des Komplexes sollte die Fähigkeit zur Bindung von Pyruvat wiederherstellen. Tab. 18 zeigt, daß dem nicht so ist. Rekonstituierte PDH band 1-^{14}C-Pyruvat nicht, während native PDH in gleicher Konzentration die erwartete Bindung zeigte. Es sind mehrere Ursachen für dies Verhalten denkbar (s. Diskussion), wesentlich ist jedoch, daß katalytische Aktivität und Bindung von Pyruvat in der Gleichgewichtsdialyse voneinander trennbare Vorgänge zu sein scheinen.

Die Bindungsstudien mit Rohextrakten aus Wildtypen zeigen, daß Bindung von 1-^{14}C-Pyruvat und 2-^{14}C-Pyruvat nur unter bestimmten Bindungen stattfindet.

Die Pyruvatdehydrogenase darf nicht mehr als 0,1% ihrer katalytischen Aktivität im Rohextrakt entfalten, damit eine meßbare Bindung von Pyruvat vorhanden ist. Erforderlich sind etwa 2 mg PDH/ml im Dialysier-Ansatz. Ebenso konnte Bindung von 2-^{14}C-Pyruvat in verschiedenen Konzentrationen an isoliertem Enzym-Komplex demonstriert werden. Bei gleicher 2-^{14}C-Pyruvat-Konzentration für den Wildtyp-Rohextrakt und die angereicherte PDH-Fraktion wurde Bindung gleichen Ausmaßes gefunden.

Tabelle 18 Einfluß der Enzym-Komponente E1 im Rohextrakt der Mutante Ace 10 auf die Bindung von 1-^{14}C-Pyruvat (4,65 mC/mM) nach Gleichgewichtsdialysen in 0,1 M K-Phosphatpuffer (s.meth.Teil).

Protein-Konzentration mg/ml	P D H	Sp.A.d.PDH	PDH-Konzentration mg/ml	1-^{14}C-Pyruvat-Konzentration	Gleichgewichtsdialyse: Verhältnis der I.p.m.v. innen zu außen
58	Rohextrakt von Ace 10	210	2,44	$7,8 \times 10^{-7}$ M	1,1
29	angereicherter Partial-Komplex E2-E3	330	1,95	$8,4 \times 10^{-7}$ M	1,3
10	angereicherter Enzym-Komplex E1-E2-E3	965	1,93	$8,4 \times 10^{-7}$ M	2
58	rekonstituierter Enzym-Komplex Ace 10: $E1^{+}E2^{-}E3^{+}$ + E2-E3	172	1,99	$8,4 \times 10^{-7}$ M	1

Anhang: Das Problem des Pyruvat-Oxidase-Systemes

a) Hinweise über seine Funktion im Stoffwechsel

Zum Abschluß der Untersuchungen über die Regulation der Pyruvatdehydrogenase-Synthese wurde die damit auftauchende Frage über die Funktion des Pyruvat-Oxidase-Systemes im Stoffwechsel von E. coli angegangen. Wie schon eingangs erwähnt, katalysiert das kristallisierbare Flavoprotein die Thiaminpyrophosphat-abhängige oxidative Decarboxylierung des Pyruvates unter Übertragung der Elektronen auf ein Cytochrom-System (43).

Vom Ausfall der katalytischen Aktivität der Pyruvatdehydrogenase durch Mutation ist dieses Enzym nicht betroffen. Trotzdem ist es nicht in der Lage, in PDH-Mutanten das Acetatbedürfnis in der Zelle zu befriedigen. In vitro weist die Pyruvat-Oxidase stets meßbare katalytische Aktivität auf. Um dieses Verhalten zu erklären, wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß die Oxidase-Synthese unter den Wachstumsbedingungen, unter denen Acetatmangel-Mutanten gewöhnlich auf ihr Acetatbedürfnis geprüft werden (Minimal-Succinat-Medien), nicht induziert ist.

Es läge dann vielleicht zu wenig Enzym vor, um den Acetatmangel zu beheben. Gounaris und Hager (44) hatten schon vermutet, daß die Oxidase durch Pyruvat induzierbar ist. Um dies zu prüfen, wurden folgende Experimente angestellt.

Die Tripel-Mutante K_2-lt-5c/Ace 10 (PPS^-, PDH^-, Icl^c) schied bei Wachstum auf Glucose unter Zusatz von Acetat Pyruvat in das Medium aus. Sollte die Pyruvat-Oxidase während des Wachstums eine zunehmende katalytische Aktivität aufgrund ihrer ansteigenden Syntheserate entfalten, so sollte dies an der Ausscheidung des Pyruvates sichtbar werden. Abb. 15 demonstriert jedoch, daß nach Erreichen des maximalen Ausscheidungswertes für Pyruvat dieser danach keine Abnahme zeigte.

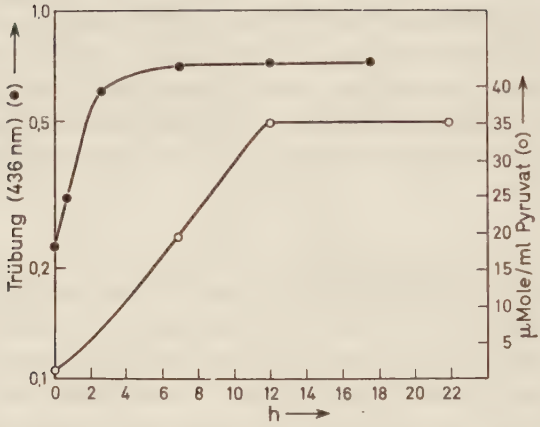


Abb. 15 Ausscheidung von Pyruvat bei Wachstum der Tripel-Mutante K_2-lt-5c/Ace 10 (PPS^-, PDH^-, Icl^c) in Glucose (28 mM) unter Acetatzusatz (4 mM).

Wuchs die Doppelmutante K_2-1t-5c/Ace 10 (PPS^+, PDH^-, Icl^c) mit wiedererlangter katalytischer Aktivität der Phosphoenolpyruvat-Synthase auf Glucose unter Acetatzusatz, erreichte die Pyruvatausscheidung ebenfalls einen maximalen Wert. Im Gegensatz zur Tripel-Mutante wurde für die Doppel-Mutante (Abb. 16) danach eine Pyruvatabnahme im Medium festgestellt. Diese Beobachtungen machen deutlich, daß die Phosphoenolpyruvat-Synthase und nicht die Pyruvat-Oxidase für die Pyruvatabnahme im Medium von Mutanten mit defekter Pyruvatdehydrogenase verantwortlich ist.

b) Charakterisierung der oxidativen Decarboxylierungs-Reaktion mit α-Ketooctansäure als Substrat

Im Zusammenhang mit Induktionsexperimenten, in denen längerkettige α-Ketosäuren auf induzierende Aktivitäten geprüft wurden, wurde für eine ihrer Vertreter Transport in die Zellen der Mutante AB 287/Ace 10 (Abb. 12; A) nachgewiesen. Mit α-Ketooctanoat ließ sich manometrisch Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxid-Freisetzung in der gleichen Zellsuspension feststellen, bei einer Zellzahl von $6x10^{11}$ im Inkubationsansatz wurden 0,65 µMole Sauerstoff (1/2 O_2) in 2,5 Minuten aufgenommen. Dagegen verschwanden in dem Aufnahmeversuch bei gleicher Zellzahl in der gleichen Zeit (Abb. 12; A) etwa 3 µMole α-Ketooctanoat. Somit wird der Transport der α-Ketosäure in die Zellen um den Faktor 4,5 schneller bewerkstelligt als die nachfolgende Oxidation abläuft. Da die PDH α-Ketooctanoat nicht oxidieren kann und da der benutzte Stamm keine intakte PDH besitzt, lag es nahe, das Pyruvat-Oxidase-System für die beobachtete Oxidation verantwortlich zu machen. Da die Pyruvat-Oxidase durch ihr absolutes Bedürfnis für TPP zu charakterisieren ist, würde sein Fehlen oder nur eine sehr geringe Konzentration in den Zellen die α-Ketooctanoat-Oxidation beeinflussen. Tatsächlich beobachtete man in der Zellsuspension des Stammes AB 287 (Thi^-) nach Thiamin-freiem Wachstum auf Glucose eine langsamere α-Ketooctanoat-Aufnahme (Abb. 12; B) als in der des Stammes AB 287/Ace 10 (Thi^-, PDH^-) nach

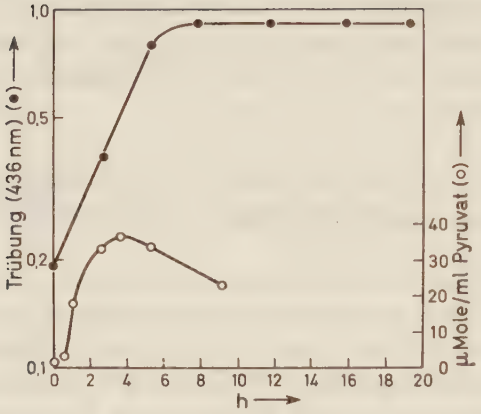


Abb. 16 Ausscheidung von Pyruvat bei Wachstum der Doppelmutante K_2-lt-5c/Ace 10 (PPS^+, PDH^-, Icl^c) auf Glucose (28 mM) unter Acetatzusatz (4 mM).

Wachstum mit Thiamin (Abb. 12; A). Beide Stämme besaßen etwa gleiche spezifische Aktivitäten der PDH im Enzym-Test mit TPP. Jedoch wies die Pyruvatdehydrogenase des Stammes AB 287 (Thi^-) nur 0,1 % ihrer spezifischen Aktivität in Abwesenheit des Cofaktors im Enzym-Test auf und demonstrierte damit den TPP-Mangel der verwendeten Zellen (Abb. 12; B).

c) Absolute Abhängigkeit der oxidativen Decarboxylierungs-Reaktion von TPP und spezifische Stimulierung durch Laurylsulfat

Es war jetzt zu prüfen, ob die beobachtete Oxidation, wie vermutet, von der Pyruvat-Oxidase ausgeführt wurde. Zur enzymatischen Charakterisierung wurde die komplett polare Mutante Ace 64 herangezogen, eine Amber-Mutante im E1-Gen, die weder E1 noch E2 in nachweisbaren Mengen produziert. Messungen von Ketosäure-Oxidation mit künstlichen Elektronenacceptoren können dann nicht von der PDH oder ihrer E1-Komponente beeinflußt werden.

Zur Demonstration des absoluten TPP-Bedürfnisses der Pyruvat-Oxidase in einem Rohextrakt der Mutante muß dieser vor Messung der TPP-Abhängigkeit von dem Cofaktor befreit werden. Nach Chromatographie auf Sephadex G 25 (s. meth. Teil) erwiesen sich Rohextrakte der Mutante unfähig, ohne TPP im Enzym-Test eine Umsetzung des Pyruvates (Abb. 17) und des α-Ketooctanoates (Abb. 18) durchzuführen. Der für die Pyruvat-Oxidase beschriebene spezifische Stimulierungseffekt durch Lauryl-sulfat in einer Konzentration von $5{,}25 \times 10^{-4}$M war ebenfalls vorhanden (Abb. 17). Eine weitere Evidenz für die Wirkung der Pyruvat-Oxidase in den Umsetzungen der α-Ketosäuren lieferte der Vergleich der gemessenen Sauerstoffaufnahme ruhender Zellen mit der umgesetzten Menge an α-Ketosäure nach Chromatographie eines Rohextraktes von Ace 64 auf Sephadex G 25. 1 mg Protein dieses Rohextraktes (Abb. 18) oxidierte in einer Stunde 0,12 µMole α-Ketooctanoat. Unter den verwendeten Wachstumsbedingungen entspricht 1 mg lösliches Zellprotein $6{,}85 \times 10^9$

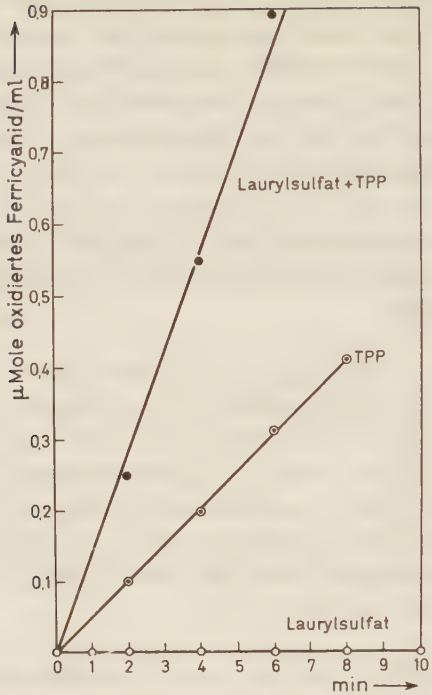


Abb. 17 Spezifische Stimulierung der Thiaminpyrophosphat-abhängigen Umsetzung von Pyruvat im Rohextrakt von Ace 64 nach Chromatographie auf Sephadex G25 (s.meth.Teil).

Das Testvolumen betrug 1,91 ml und enthielt 0,02 ml $K_3Fe(CN)_6$ (0,1 M), 0,02 ml TPP (0,1 M), 0,02 ml Na-Pyruvat (0,5 M) und 1 µMol Laurylsulfat. Stets wurden 3,54 mg Rohextrakt (8,85 mg/ml) eingesetzt. (●)= Laurylsulfat und TPP im Test, (⊙)= ohne Laurylsulfat und mit TPP im Test, (o)= ohne TPP und mit Laurylsulfat im Test.

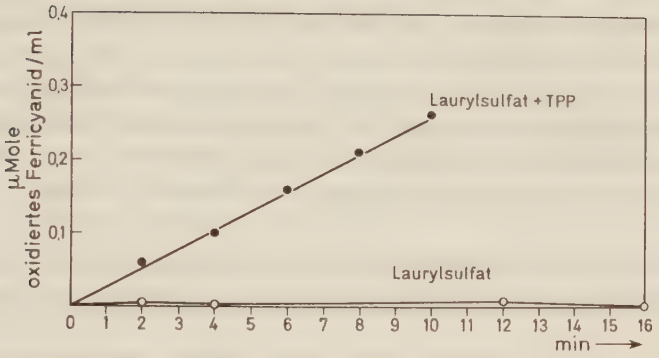


Abb. 18 Thiaminpyrophosphat-abhängige Umsetzung von α-Ketooctanoat im Rohextrakt von Ace 64 nach Chromatographie auf Sephadex G25 (s.meth.Teil).

Das Testvolumen betrug 1,91 ml und enthielt 0,02 ml $K_3Fe(CN_6)$ (0,1 M), 0,02 ml TPP (0,1 M), 0,02 ml K-α-Ketooctanoat (0,5 M) und 1 µMol Laurylsulfat. Es wurde 2,73 mg Rohextrakt (4,55 mg/ml) eingesetzt. (●) = Laurylsulfat und TPP im Test, (o) = ohne TPP und mit Laurylsulfat im Test.

Zellen. Somit ergab sich für den Rohextrakt (Abb. 18) ein Umsatz von etwa 10 µMolen α-Ketooctanoat pro Stunde und $6x10^{11}$ Zellen. Die Messung der Sauerstoffaufnahme ruhender Zellen ergab 12 µMole 1/2 O_2 pro Stunde und $6x10^{11}$ Zellen. In einer zweiten unabhängigen Rechnung wurde in einer angereicherten Pyruvat-Oxidase (Tab. 19) ein Umsatz von 0,08 µMolen α-Ketooctanoat pro Stunde und mg Protein ermittelt. Erfolgte die Umrechnung des Umsatzes auf den Rohextrakt vor den Anreicherungsschritten, so ergab sich eine Oxidation von etwa 7 µMolen α-Ketooctanoat pro Stunde und $6x10^{11}$ Zellen.

d) Umsetzungen von α-Ketosäuren mit einer angereicherten Pyruvat-Oxidase aus der Mutante Ace 64

Die Resultate sprechen sehr stark dafür, daß für die Decarboxylierung längerkettiger α-Ketosäuren in E. coli die Pyruvat-Oxidase verantwortlich ist. Da α-Ketooctansäure von der Pyruvat-Oxidase umgesetzt wurde, war zu prüfen, ob die übrigen α-Ketosäuren ebenfalls als Substrate in dem Enzym-Test mit Ferricyanid als Elektronenacceptor dienen könnten. Über die Substratspezifität des E. coli Enzymes sind keine Angaben vorhanden. Der Pyruvat-Oxidase in Proteus vulgaris wird eine strenge Substratspezifität für Pyruvat zugeschrieben (35). Daher wurde ein Rohextrakt der Mutante Ace 64 einer Anreicherung für die Pyruvat-Oxidase unterworfen. Tab. 19 demonstriert, daß sämtliche α-Ketosäuren von der angereicherten Fraktion umgesetzt werden. Für α-Ketocaproat fand sich eine höhere spezifische Aktivität als für α-Ketovaleriansäure. Die gleiche Beobachtung traf auch für die α-Ketononansäure und α-Ketodecansäure zu. Die α-Ketooctansäure lieferte niedrigere spezifische Aktivitäten als die längerkettigen Analogen. Die Erklärung für das Verhalten des Enzymes diesen α-Ketosäuren gegenüber liegt wohl in deren oberflächenaktiven Eigenschaften. Die Pyruvat-Oxidase, deren Aktivität durch Agenzien wie Laurylsulfat in sehr geringen Konzentrationen stimuliert wird, unterlag wahrscheinlich einer zusätzlichen Aktivierung durch α-Ketocaproat. Dieser mögliche Effekt reichte dann aus, eine

Tabelle 19 Umsetzung von α-Ketosäuren mit einer angereicherten Pyruvat-Oxidase aus der Mutante Ace 64 (s. meth. Teil).

Substrat	Sp. A. d. Pyruvat-Oxidase mit Ferricyanid als Elektronenacceptor
Na-Pyruvat	0,44
K-α-Ketobutyrat	0,21
K-α-Ketovaleriat	0,16
K-α-Ketoisovaleriat	0,13
K-α-Ketocaproat	0,19
K-α-Ketoisocaproat	0,025
K-α-Ketooctanoat	0,10
K-α-Ketononanoat	0,15
K-α-Ketodecanoat	0,12

höhere spezifische Aktivität mit α-Ketocaproat als Substrat zu bewirken. Die C_9 und C_{10}-α-Ketosäuren bewirkten aufgrund ihrer ebenfalls stark ausgeprägten oberflächenaktiven Eigenschaften eine Stimulierung der Pyruvat-Oxidase und wurden als Substrate schneller umgesetzt als die α-Ketooctansäure.

Die Studien über das Pyruvat-Oxidase-System in E. coli zeigen, daß dieses Enzym-System als α-Ketosäure-Oxidase aufgefaßt werden darf. Damit steht das Pyruvat-Oxidase-System aus diesem Bakterium hinsichtlich seiner Substratspezifität im Gegensatz zu dem sehr verwandten Enzym-System aus Proteus vulgaris.

Insgesamt ist zu folgern, daß es fraglos dieses Enzym ist, das für die Oxidationen aller Pyruvatanaloga verantwortlich ist, die mit ganzen Zellen geprüft wurden. Offenbar besteht daher das Paradox, daß Zellen, denen die PDH vollständig fehlt, Pyruvat-Oxidase enthalten, aber dennoch ein Acetatbedürfnis aufweisen und unfähig sind, akkumuliertes Pyruvat zu oxidieren, solange der Weg zum Oxalacetat nicht offen ist.

Es ist jedoch vollständig unklar, was die physiologische Funktion der Oxidase sein mag. Die Möglichkeit wurde geprüft, daß das Enzym nur bei relativ hohen Pyruvat-Konzentrationen und in Abwesenheit von Glucose induzierbar ist. Man würde dann erwarten, daß die Tripel-Mutante K_2-lt-5c/Ace 10 auf Pyruvat als einziger C-Quelle gerade so wie auf Acetat wachsen kann. Die Mutante wuchs aber nicht auf Pyruvat, und die Frage nach der Funktion dieses Enzymes blieb ungelöst.

Diskussion

1. Eliminierung von Hydroxyäthyl-TPP als gemeinsamen Effektor der Isocitrat-Lyase und der Pyruvatdehydrogenase-Synthese

Ausführliche Studien von H. L. Kornberg und Mitarbeitern haben gezeigt, daß Pyruvat, Phosphoenol-pyruvat oder ein naher Abkömmling dieser eine reprimierende Wirkung auf die Synthese der Icl zukommt.

Kornberg vermutete, daß unter Umständen Hydroxyäthyl-TPP der reprimierende Effektor der Icl-Synthese sei, der durch die katalytische Aktivität der Komponente E1 der PDH gebildet wird. Träfe dies zu, würde ein einleuchtender Regulationsmechanismus für die Synthese der PDH und Icl in einer zweifachen Rolle des Hydroxyäthyl-TPP bestehen. Einmal käme ihm eine induzierende Wirkung auf die PDH-Synthese und zum zweiten eine reprimierende Wirkung auf die Icl-Synthese zu. Das umgekehrte Verhalten der beiden Enzym-Synthesen auf den gleichen Kohlenstoffquellen (Tab. 1) wäre somit zu erklären.

Die hypothetische zweifache Rolle des Hydroxyäthyl-TPP wurde durch die vorliegenden Resultate eindeutig widerlegt.

Im Fall der Icl wurde unter bestimmten Bedingungen bei Mutanten ohne enzymatisch oder immunologisch nachweisbare PDH-Komponenten ein Absinken ihrer spezifischen Aktivitäten um den gleichen Betrag gegenüber den Icl-Aktivitäten in Wildtypen festgestellt wie bei Mutanten mit katalytisch aktiver Komponente E1 der PDH (Tab. 2).

Für die Pyruvatdehydrogenase konnte die induzierende Wirkung des Pyruvates auf die Synthese der infolge TPP-Mangels in vivo katalytisch inaktiven freien Komponente E1 und auf die der gleichartig inaktiven Pyruvatdehydrogenasen demonstriert werden (Tab. 13, 14).

2. Evidenzen gegen eine Rolle von Zwischenprodukten der Glykolyse als Effektoren der PDH-Synthese

Versuche mit der Mutante h8 schlossen Zwischenstufen der Glykolyse bis zum Fructose-1-6-diphosphat als reprimierende oder induzierende Effektoren der PDH-Synthese aus. Herabsetzung der katalytischen Aktivität der Fructose-1-6-diphosphat-Aldolase in der Mutante bei 35°C führte bei Glucoseabbau zum Anstau dieser Zwischenstufen, der bei Wachstum mit Acetat als alleiniger C-Quelle ausblieb. In beiden Fällen besaß die Mutante gleiche spezifische Aktivitäten der PDH und demonstriert mit diesen Werten eindeutig gegen eine indirekte Wirkung des Pyruvates auf Reaktionen, die der Aldolase-Reaktion vorgeschaltet sind.

Gegen eine mögliche stimulierende oder hemmende Wirkung des Pyruvates auf Reaktionen, deren Substrate oder Reaktionsprodukte Triosephosphate darstellen und als Effektoren der PDH-Synthese wirken könnten, sprechen Experimente mit der Tripel-Mutante K_2-lt-5c/Ace 10.

Bei Wachstum der Tripel-Mutante auf Glucose wird Pyruvat akkumulicrt, (Abb. 15), damit verbunden sind hohe spezifische Aktivitäten der Komponente E1 der PDH. Dieses Ergebnis könnte auf folgende Weise erklärt werden. Wenn B $\rightleftharpoons$ C eine Reaktion in der Umwandlung der Triosephosphate bei der Glykolyse ist, könnte Pyruvat das entsprechende Enzym hemmen und damit zum Anstieg der Konzentration von B führen. Wäre B der induzierende Effektor für die PDH-Synthese, würde so das Pyruvat seine Wirkung indirekt entfalten. Induktion erfolgt jedoch auch bei Wachstum der Tripel-Mutante auf Acetat nach Zusatz von Pyruvat (Abb. 9). Hemmung der Reaktion B $\rightleftharpoons$ C hätte jetzt, da ja auf Acetat die glykolytischen Reaktionen der Biosynthese dienen, eine Erhöhung der Konzentration von C zur Folge. Es ist klar, daß das Pyruvat so nicht wirken kann.
Es ist jedoch möglich, daß Hin- und Rückreaktion B $\rightleftharpoons$ C von verschiedenen Enzymen katalysiert werden (wie es z.B. bei

der Umwandlung Phosphoenolpyruvat $\rightleftharpoons$ Pyruvat der Fall ist). Würde Pyruvat das Enzym der Reaktion B $\longrightarrow$ C hemmen und das Enzym der Rückreaktion B $\longleftarrow$ C aktivieren, so könnte doch die Substanz B als Effektor der PDH-Synthese in Frage kommen. Dieser Fall ist ad hoc konstruiert und außerordentlich unwahrscheinlich. Es wäre völlig unverständlich, warum die Synthese der katabolisch arbeitenden PDH über die Stimulierung eines Biosynthese-Enzymes durch das abzubauende Substrat gesteuert werden sollte.

3. Evidenzen gegen eine gemeinsame Regulation der PDH- und α-KGDH-Synthesen in E. coli

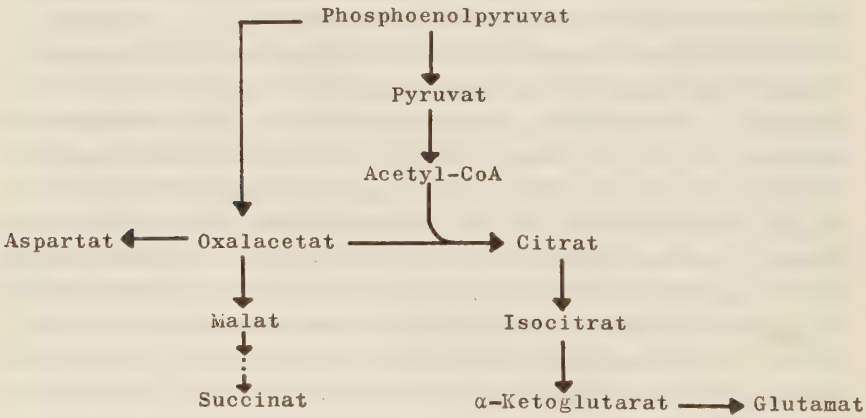
Unter den geschilderten Versuchsbedingungen wurde das Verhalten des ersten Komponenten (Decarboxylase; E1) der α-Ketoglutarsäuredehydrogenase im Wildtyp Y-Mel (Tab. 1) und in der Tripel-Mutante K_2-lt-5c/Ace 10 untersucht (Tab. 5).

Aufgrund biochemischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungen der α-KGDH liegt eine nahe Verwandtschaft dieses Multienzym-Komplexes mit der Pyruvatdehydrogenase hinsichtlich Anordnung und katalytischer Funktion der 3 beteiligten Enzyme vor. Besonders deutlich zeigt dies das Enzym 3 (Dihydrolipoamiddehydrogenase) der zwei α-Ketosäuredehydrogenasen. E3 ist zwischen beiden Enzym-Komplexen austauschbar. Weitere Studien zeigten, (45) daß die Komponente E3 der beiden Enzym-komplexe an Hand verschiedener physikalischer, chemischer und immunologischer Kriterien nicht unterscheidbar ist. Diese Tatsachen könnten eine gemeinsame Regulation der Synthesen beider Enzym-Komplexe wahrscheinlich machen. Jedoch lieferten die spezifischen Aktivitäten der Komponente E1 der α-KGDH im Wildtyp und in der Mutante keine Anhaltspunkte dafür. Auf den Kohlenstoffquellen Pyruvat und Acetat zeigte der Wildtyp den markantesten Unterschied in den PDH-Mengen, während auf den gleichen Kohlenstoffquellen keine Unterschiede in den E1-Mengen der α-KGDH festgestellt wurden (Tab. 1).

Verabreichte man der Mutante K_2-lt-5c/Ace 10 (Tab. 5) Pyruvat während ihres Wachstums auf Acetat, so wurde die E1-Synthese der PDH induziert. Dagegen wurde in denselben Zellen eine nahezu unveränderte Menge an E1 der α-Ketoglutarsäuredehydrogenase angetroffen. Dies demonstriert, daß ausschließlich die Pyruvatdehydrogenase Ziel der induzierenden Aktivität des Pyruvates ist.

Zwei Beobachtungen sollen noch diskutiert werden, die das Verhalten der α-KGDH im Wildtyp deutlich kennzeichnen. Nach Wachstum auf α-Ketoglutarat als alleiniger Kohlenstoffquelle wurden die höchsten spezifischen Aktivitäten ihrer Komponente E1 angetroffen. Nach anaerobem Wachstum auf Glucose dagegen wurde nur 15% der spezifischen Aktivität gemessen, die nach aerobem Glucoseabbau angetroffen wurde (Tab. 1).

Unter anaeroben Bedingungen funktioniert der oxidative Endabbau in E. coli nicht in cyclischer Weise. Teile des Citronensäure-Cyclus dienen biosynthetischen Zwecken:



Ein reduktiver Zweig liefert Succinat, Aspartat und die daraus stammenden Aminosäuren. Ein oxidativer Zweig führt zu α-Ketoglutarat und damit zur Glutaminsäure und den daraus zu

bildenden Aminosäuren. Mithin darf man annehmen, daß unter diesen Bedingungen wesentlich geringere intrazelluläre α-Ketoglutarat-Konzentrationen benötigt werden als unter aeroben Bedingungen bei Abbau der Glucose, des α-Ketoglutarates und Acetates. In Kenntnis der vorliegenden Daten und in Übereinstimmung mit Amarasingham und Davis (46) liegt die Vermutung nahe, daß dem Substrat α-Ketoglutarat ebenfalls die Rolle des internen Induktors der α-KGDH-Synthese zukommt.

4. Funktion des phosphoroklastischen Systemes und der PDH unter anaeroben Bedingungen

Nicht aufgeführte Versuche mit der Acetatmangel-Mutante Coli B/Ace 10 demonstrieren, daß unter anaeroben Bedingungen nicht ausschließlich das phosphoroklastische System das aus der Glykolyse angelieferte Pyruvat zu Acetyl-CoA und Formiat umsetzt.

Wachstum von Coli B/Ace 10 unter Anaerobiosis in Minimalmedien mit Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle geht ohne Acetat-Zusatz vonstatten (47), da Acetyl-CoA durch die phosphoroklastische Reaktion hinreichend gebildet wird.

Doch wird in diesen Zellen ohne PDH-Aktivitäten Pyruvat akkumuliert. Da unter aeroben Bedingungen die gleichen Zellen bei Wachstum mit Glucose unter Acetat-Zusatz auch Pyruvat akkumulieren und eine induzierte E1-Synthese der PDH besitzen, müßte in den anaeroben Zellen ebenfalls eine Induktion der E1-Synthese erfolgt sein. Tatsächlich wurden gleiche spezifische Aktivitäten der Komponente E1 in Coli B/Ace 10 nach anaerober Glucosevergärung und aerobem Abbau dieser C-Quelle unter Acetat-Zusatz gemessen.

Diese Experimente deuteten daraufhin, daß die intakte PDH unter Anaerobiosis neben dem phosphoroklastischen System ein Teil des angelieferten Pyruvates umsetzte.

Wuchs der Wildtyp Y-Mel unter anaeroben Bedingungen auf Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle, so wurde keine Pyruvat-Abgabe in das Medium festgestellt. Die Zellen besaßen 20-30% der PDH-Mengen, die nach Wachstum auf Glucose unter Aerobiosis angetroffen wurde (Tab. 1). Dieses Resultat zeigt, daß die verbleibende katalytische Aktivität der PDH unter Anaerobiosis für eine vollständige Umsetzung des angelieferten Pyruvates aus dem Glucoseabbau sorgt.

5. Die Bindung von C^{14}-Pyruvat an PDH und ihre E1-Komponente

In mehreren Fällen (48) konnte gezeigt werden, daß Bindungsorte für Substrate und Effektoren von Enzymen verschieden sind und sogar auf verschiedene Untereinheiten der Enzym-Proteine verteilt sein können. Z.B. können Effektoren, welche vom Enzym gebunden werden eine gänzliche andere Struktur als die Substrate besitzen (Allosterie). Ihre Wirkung bei Bindung an ein Enzym besteht in der Steigerung oder Hemmung seiner katalytischen Aktivitäten.

Im Fall der PDH könnte Pyruvat als Substrat zugleich auch ein Effektor dieser Art darstellen und bei Bindung an das Enzym seine katalytische Aktivität steigern. Die beobachtete Unfähigkeit der Komponente E1 der PDH, Pyruvat unter den verwendeten Versuchsbedingungen in den Gleichgewichtsdialysen zu binden, könnte einer charakteristischen Eigenschaft dieses Enzymes als einem allosterischen Protein zugeschrieben werden. Abtrennung der Komponente E1 vom nativen Enzym-Komplex in vitro unter relativ milden Umständen mag zum Verlust ihrer Bindungsfähigkeit für den Effektor führen, das katalytische Wirkungszentrum und damit die Fähigkeit zur Umsetzung des Pyruvates als Substrat bleibt aber erhalten. Im Fall der Mutante Ace 10, die die ungebundene Komponente E1 produziert, tritt offenbar eine Aggregation des Enzym-Proteines schon in der Zelle oder möglicherweise bei ihrer Gewinnung durch den Zellaufschluß auf (49). Damit mag eine Beseitigung des Bindungsortes für

den Effektor Pyruvat verbunden sein, die katalytische Aktivität bleibt jedoch ebenfalls erhalten.

Eine zweite Möglichkeit kann auch in Betracht gezogen werden; der festgestellte Bindungsort der PDH für Pyruvat in den Gleichgewichtsdialysen steht mit der Regulation der Enzym-Synthese im Zusammenhang. Verlust der Bindungsfähigkeit für den Effektor könnte in gleicher Weise geschehen wie für die erste geschilderte Möglichkeit.

6. Zur physiologischen Bedeutung von Produkt- und Substrat-Induktion

Mehrere Studien (50, 51), die sich mit der Regulation der Synthesen katabolischer Enzyme in Mikroorganismen befassen, zeigten die gleiche Art der Induktion für die Enzym-Synthesen auf. Die Substrate der Enzyme wirken nicht als induzierende Effektoren, dagegen stellen ihre aus der jeweiligen enzymatischen Umsetzung hervorgegangenen Reaktionsprodukte die internen Induktoren der Enzym-Synthese dar. Diese sogenannte Produktinduktion erscheint bei der Regulation katabolisch wirkender Enzyme sehr sinnvoll.

Bei nur vorübergehender Zunahme der Konzentration eines abzubauenden Substrates würde bei induzierender Aktivität des Substrates die Enzym-Synthese sofort in Gang kommen, obwohl bei plötzlicher Konzentrationsabnahme des Substrates eine erhöhte Syntheserate nicht mehr sinnvoll wäre. Würde dagegen dieser Organismus den Regulationstyp "Produktinduktion" besitzen, käme ihm der Dämpfungsmechanismus folgender Art zugute. Das Ausmaß der Induktion der Enzym-Synthese wird durch die intrazelluläre Konzentration des aus dem Substrat gebildeten Reaktionsproduktes gesteuert, das den Induktor darstellt. Das Enzym wird nur dann in den erforderlichen Mengen produziert, wenn eine dauernde und ausreichende Substrat-Konzentration gewährleistet ist, die die erforderliche intrazelluläre Induktor-Konzentration für die Synthese des Enzymes aufrecht erhält.(50).

Man sollte daher vielleicht annehmen, daß dieser Induktionstyp in der Evolution selektive Vorteile bot. Doch leuchtet dann nicht ein, warum im Fall der Regulation der Synthese der die Arabinose-abbauenden Enzyme (52) und der Pyruvatdehydrogenase-Synthese die Substrate der Enzyme die induzierenden Effektoren stellen (Substrat-Induktion), obwohl es auch diesen Fällen durchaus sinnvoll erschiene durch Produkt-Induktion die Synthesen zu regulieren. Es ist daher eher wahrscheinlich, daß die Existenz verschiedener Regulationstypen von Enzym-Synthesen der gänzlich verschiedenen Herkunft der kontrollierenden Komponenten (z.B. Regulatorgen-Produkte) zugeschrieben werden muß. Die im Verlauf der Evolution erworbenen verschiedenartigen Regulationstypen in einer sich entwickelnden biologischen Gruppe können einen stabilen Charakter besitzen, sie würden dann trotz vermutlicher Selektionsnachteile beibehalten worden sein.

Zusammenfassung

1. Es wurde eindeutig nachgewiesen, daß die Synthese der PDH in E. coli induzierbar ist. Als intrazellulärer Induktor der Enzym-Synthese wurde das Substrat Pyruvat identifiziert. Mehrere Pyruvat-Analoga besitzen ebenfalls induzierende Aktivität, die mit steigender Kettenlänge oder Verzweigung der Kette abnimmt. Abnehmende induzierende Aktivität bei steigender Kettenlänge der α-Ketosäure beruht nicht auf einem erschwerten Eintritt für diese in die Zelle.

2. Die enzymatische Aktivität des Enzym-Komplexes oder seiner Komponente E1 wird für die induzierende Wirkung des Pyruvates und seiner längerkettigen Analoga nicht benötigt. Der induzierende Effektor der PDH-Synthese kann daher nicht durch eine der katalytischen Aktivitäten des Enzym-Komplexes gebildet werden.

3. Messungen der spezifischen Aktivitäten der Isocitrat-Lyase und der Pyruvatdehydrogenase in Wildtypen und Mutanten zeigen deutlich die metabolische Verwandtschaft der Effektoren für die Icl- und PDH-Synthesen. Pyruvatdehydrogenase-Mutanten (Ace 10, Ace 64, Ace 131, Tab. 2) besaßen sehr niedrige spezifische Aktivitäten der Icl. Ihre Werte waren gegenüber denen ihrer Wildtyp-Eltern (Y-Mel, HfrH) um den Faktor 10-20 niedriger; zugleich war bei den Mutanten Pyruvatakkumulation zu beobachten. Die spezifische Aktivität der Komponente E1 der PDH (Ace 10) zeigte dagegen einen Anstieg um den Faktor 4. Weitere Versuche mit ähnlichen Mutanten (K-1-1/Ace 10, K-1-1/Ace 64, K-1-1/Ace 131, Tab. 3) demonstrierten, daß der reprimierende Effektor der Icl-Synthese nicht durch eine der katalytischen Aktivitäten der PDH gebildet werden kann.
Mutanten ohne immunologisch oder enzymatisch nachweisbare PDH-Komponenten (wie K-1-1/Ace 64, K-1-1/Ace 131) lieferten um den Faktor 5-6 geringere spezifische Icl-Aktivitäten als

der Wildtyp (K-1-1), von dem sie abstammen. Auch hier beobachtete man eine Pyruvatakkumulation. Der Ausfall der katalytischen Aktivität der Phosphorenolpyruvat-Synthese in diesen Stämmen (K-1-1 und abgeleitete Mutanten) ist nicht Ursache der beobachteten Effekte, ein Wildtyp (K-1) mit intakter PPS lieferte etwa gleiche Icl-Mengen wie K-1-1.

4. Versuche mit merodiploiden Stämmen beweisen, daß für eine maximale Induktion der PDH-Synthese hohe intrazelluläre Pyruvat-Konzentrationen erforderlich sind. Diploide Stämme mit zwei Strukturgen-Komplexen zeigen bei katalytisch aktivem Enzym-Komplex selbst nach Wachstum auf Pyruvat als Kohlenstoffquelle keinen Gen-Dosis-Effekt. Ähnliche Verhältnisse fanden sich bei diploiden Stämmen, die neben dem intakten Strukturgen-Komplex einen mutierten Ace-Locus tragen und zusätzlich die ungebundene Komponente E1 produzieren.
   In beiden Fällen darf die katalytische Aktivität der PDH in vivo nicht vorhanden sein, wenn eine maximale Induktion der Enzym-Synthese durch das angestaute Pyruvat in Erscheinung treten soll.

5. Keine Hinweise konnten über eine völlig indirekte Wirkung des Pyruvates erbracht werden.
   Versuche mit einer Mutante mit Temperatur-empfindlicher Fructose-1-6-diphosphat-Aldolase zeigten, daß angestaute Zwischenstufen der Glykolyse keine regulatorische Wirkung auf die PDH-Synthese entfalten und als reprimierende Effektoren der Enzym-Synthese ausscheiden müssen.
   Nach Isolierung und Konzentrations-Messungen Phosphor 32-markierter Zwischenstufen der Glykolyse nach anaerobem Glucose- und aerobem Acetat-Abbau wurden keine deutlichen Konzentrationsunterschiede festgestellt.

6. Nach Gleichgewichtsdialysen von Rohextrakten des Wildtypes wurde Bindung von 1-^{14}C-Pyruvat und 2-^{14}C-Pyruvat in diesen festgestellt.

Gereinigte native PDH-Fraktionen mit gleicher Enzym-Konzentration wie in Wildtyp-Rohextrakten wiesen nach Gleichgewichtsdialysen mit 2-^{14}C-Pyruvat die gleichen Verteilungsverhältnisse der Radioaktivität auf.
Keine Bindung von 1-^{14}C-Pyruvat konnte in Rohextrakten einer Mutante (Ace 10) demonstriert werden, die katalytisch aktive aber nicht zum Komplex gebundene E1-Komponente produziert. Nach Assoziierung der Komponente E1 des Rohextraktes der Mutante Ace 10 mit gereinigtem Partial-Komplex E2-E3 konnte ebenfalls keine Bindung von 1-^{14}C-Pyruvat im rekonstitutierten Enzym-Komplex festgestellt werden. Diese Daten lassen vermuten, daß die PDH zwei verschiedene Bindungsorte für Pyruvat besitzt.

7. Studien mit Mutanten über die Funktion der Pyruvat-Oxidase im Stoffwechsel von E. coli widerlegten die Vermutung, daß die Induktion der Enzym-Synthese in späten logarithmischen Wachstumsstadien durch hohe intrazelluläre Pyruvat-Konzentrationen bewirkt wird. Für die oxidative Decarboxylierung der längerkettigen verzweigten und unverzweigten Analoga des Pyruvates konnte die katalytische Aktivität des Pyruvat-Oxidase-Systemes von E. coli verantwortlich gemacht werden. Aufgrund des absoluten TPP-Bedürfnisses und der spezifischen Stimulierbarkeit durch Laurylsulfat entsprach das Verhalten des Enzym-Systems den beschriebenen Befunden. Mit einer angereicherten Pyruvat-Oxidase wurde eindeutig festgestellt, daß längerkettige α-Ketosäuren als Substrate dienen können.

Verzeichnis der Abkürzungen

Ace	Acetat
Arg	Arginin
CoA	Coenzym A
CSC	Citronensäure-Cyclus
2,6-DCIP	2,6-Dichlorphenolindophenol
Enzym 1, E1	Decarboxylase-Komponente
Enzym 2, E2	Dihydrolipoamid-Trans-acetylase-Komponente
Enzym 3, E3	Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Komponente
F'_{TS}	Episom mit Temperatur-empfindlicher Replication
Fruc-1-6-P-A	Fructose-1-6-diphosphat-Aldolase
h	Stunde
His	Histidin
Icl	Isocitrat-Lyase
Icl^c	Konstitutive Isocitrat-Lyase-Synthese
IPTG	Isopropylthiogalactosid
Ipm	Impulse pro Minute
α-KGDH	α-Ketoglutarsäuredehydrogenase-Komplex
Leu	Leucin
M	Molar
MG	Molekulargewicht
mM	Millimolar
mC	Millicurie
Met	Methionin
min	Minuten

PDH	Pyruvatdehydrogenase-Komplex
PPC	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
PPS	Phosphoenolpyruvat-Synthase
Sp.A	Spezifische Aktivität
Thi	Thiamin
TPP	Thiaminpyrophosphat
Thr	Threonin
Thy	Thymin
Trp	Tryptophan
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V/V	Volumenanteile

Literaturverzeichnis

(1) L. J. Reed and D. J. Cox, Ann. Rev. Biochem. 35, 57 (1966).

(2) M. Koike, L. J. Reed, and W. R. Carroll, J. Biol. Chem. 235, 1924 (1960).

(3) I. C. Gunsalus, In: W. D. McElroy and B. Glass, A Symposium on the Mechanism of Enzyme Action, John Hopkins Press, Baltimore, 1954, S. 545.

(4) M. Koike, L. J. Reed, and W. R. Carroll, J. Biol. Chem. 238, 30 (1963).

(5) U. Henning und C. Herz, Z. Vererbungslehre 95, 260 (1964).

(6) U. Henning, G. Dennert, R. Hertel, and W. S. Shipp, Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 31, 227 (1966).

(7) M. O. Oster, and L. P. Hager, Bacteriol. Proc. 101 (1964).

(8) R. A. Cooper and H. L. Kornberg, Biochim. Biophys. Acta 104, 618 (1965).

(9) U. Henning, J. Dietrich, K. N. Murray, and G. Deppe, Wiss. Konferenz d. Ges. Deutscher Naturforscher u. Ärzte, "Molecular Genetics", Berlin 1967, Springer-Verlag.

(10) E. S. Lennox, Virology 1, 190 (1955).

(11) G. Beisenherz et al, Z. Naturforsch. 8b, 555 (1953)

(12) L. J. Reed, F. R. Leach, and M. Koike, J. Biol. Chem. 232, 123 (1958).

(13) S. Korkes, A. Del. Campillo, I. C. Gunsalus, and S. Ochoa, J. Biol. Chem. 193, 721 (1951).

(14) L. P. Hager, Ph. D. Dissertation, University of Illinois, 1953.

(15) P. K. Stumpf, K. Zarudnaya, and D. E. Green, J. Biol. Chem. 167, 817 (1947).

(16) J. S. Moyed and D. J. O'Kane, J. Biol. Chem. 218, 831 (1956).

(17) F. R. Williams and L. P. Hager, Arch. Biochem. Biophys. 116, 168 (1966).

(18) G. H. Dixon and H. L. Kornberg, Biochem. J. 72, 3P (1959).

(19) H. L. Kornberg, Biochem. J. 99, 1 (1966) (Colworth Medal Lecture).

(20) S. H. Hestrin, D. S. Feingold, and M. Schramm, In: S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Methods in Enzymology, 1, 241 (1955).

(21) U. Henning, C. Herz und K. Szolyvay, Z. Vererbungslehre 95, 236 (1964).

(22) G. A. Bray, Anal. Biochem. 1, 279 (1960).

(23) A. V. Morey and E. Juni, J. Biol. Chem. 243, 3009 (1968).

(24) A. A. Benson, In: S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Methods in Enzymology, 3, 111 (1957).

(25) A. A. Benson, In: S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Methods in Enzymology, 3, 116 (1957).

(26) C. P. Dietrich, S. M. C. Dietrich, and H. G. Pontis, J. Chromatog. 15, 277 (1964).

(27) H. G. Pontis and C. L. Fischer, Biochem. J. 89, 452 (1963).

(28) A. A. Benson, In: S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Methods in Enzymology, 3, 113 (1957).

(29) K. Kubowitz und P. Ott, Biochem. Z. 314, 94 (1943).

(30) H. Chantrenne and F. Lipmann, J. Biol. Chem. 187, 757 (1950).

(31) T. E. Friedemann and G. E. Haugen, J. Biol. Chem. 147, 415 (1943).

(32) C. Gilvarg and B. D. Davis, J. Biol. Chem. 222, 307 (1956).

(33) H. L. Kornberg and J. R. Sadler, Biochem. J. 81, 503 (1961).

(34) R. S. Wolfe and D. J. O'Kane, J. Biol. Chem. 205, 755 (1953).

(35) P. K. Stumpf, J. Biol. Chem. 159, 529 (1945).

(36) J. J. R. Campbell, R. A. Smith, and B. A. Eagles, Biochim. Biophys. Acta 11,594 (1953).

(37) H. L. Kornberg and J. Smith, Biochim. Biophys. Acta 123, 654 (1966).

(38) K. Bartholomé und U. Henning, Unveröffentliche Versuche (1965).

(39) A. Böck and F. C. Neidhardt, J. Bacteriol. 92, 464 (1966).

(40) A. Böck and F. C. Neidhardt, J. Bacteriol. 92, 470 (1966).

(41) A. Newton, Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 28, 1 (1967).

(42) F. Imamoto and C. Yanofsky, J. Molec. Biol. 28, 1 (1967).

(43) S. S. Deeb and L. P. Hager, J. Biol. Chem. 239, 1024 (1964).

(44) A. D. Gounaris and L. P. Hager, J. Biol. Chem. 236, 1013 (1961)

(45) F. H. Pettit and L. J. Reed, Proc. Nat. Acad. Sci. 58, 1126 (1967).

(46) C. R. Amarasingham and B. D. Davis, J. Biol. Chem. 240, 3664 (1965).

(47) U. Henning, Biochem. Z. 337, 490 (1963).

(48) J. P. Changeux, J. C. Gerhart, H. K. Schachman, In: V. V. Konigsberger and L. Bosch, Regulation of Nucleic Acid and Protein Biosynthesis, BBA Library, Vol. 10, S. 348 (1967) Elsevier, Amsterdam.

(49) O. Vogel, Dissertationsarbeit. Universität Tübingen (1969).

(50) N. J. Palleroni and R. Y. Stanier, J. Gen. Microbiol. 35, 319 (1964).

(51) S.J. Hayashi and E. C. C. Lin, J. Molec. Biol. 14, 515 (1965)

(52) D. E. Sheppard and E. Englesberg, J. Molec. Biol. 25, 443 (1967).

Lebenslauf

Am 23. Juni 1941 wurde ich als zweiter Sohn des Dipl.-Ing. Otto Dietrich und seiner Ehefrau Dorothea, geb. Zöbisch in Erfurt/Thüringen geboren. In Erfurt besuchte ich 5 Jahre die Grundschule und setzte nach Übersiedlung nach West-Berlin den Schulbesuch von 1952-1954 am Friedrich-Ebert-Gymnasium fort. 1954 nach Mannheim verzogen, besuchte ich dort das Kurpfalz-Gymnasium bis 1960. Im März 1960 legte ich am Oberschulamt Nordbaden die Reifeprüfung für Schulfremde ab. Im Wintersemester 1961 nahm ich das Studium der Biologie an der Universität Heidelberg auf. Vom Wintersemester 1962 bis zum Wintersemester 1965 absolvierte ich botanische Kurse, zoologische und chemische Großpraktika an der Universität Bonn. Im Wintersemester 1965 absolvierte ich am Institut für Biochemie der Universität Köln ein enzymchemisches Großpraktikum. Im Wintersemester 1968 absolvierte ich ein mikrobiologisches Großpraktikum an dem Institut für Mikrobiologie der Universität Tübingen.

Im März 1966 begann ich meine Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Genetik der Universität Köln in der Abteilung von Prof. U. Henning und begann unter seiner Anleitung an dem vorliegenden Thema zu arbeiten, das ich nach Übersiedlung nach Tübingen an das Max-Planck-Institut für Biologie im Wintersemester 1966 weiter bearbeitete und im März 1969 abschloß.

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Universität Heidelberg:	Prof. Lüdicke (Zoologie), Prof. Duspiva (Zoologie, Prof. Rauh (Botanik), Prof. Klingmüller (Physiologische Chemie)
Universität Bonn:	Prof. Danneel (Zoologie), Prof. Wurmbach (Zoologie), Prof. Wessing (Zoologie), Prof. Schuhmacher (Botanik), Prof. Stille (Mikrobiologie), Prof. Appel (Chemie)
Universität Köln:	Prof. Jaenicke (Biochemie)
Universität Tübingen:	Prof. Zähner (Mikrobiologie)